

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München



In vitro- und in vivo-Untersuchungen zur  
Regulation von HCN-Kanälen durch  
Tyrosinphosphorylierung und  
zyklische Nukleotide

Christian Eckert  
aus Eschenbach i.d.Opf.

2006

---

**Erklärung**

Diese Dissertation wurde im Sinne von §13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Herrn Prof. Dr. Martin Biel betreut.

**Ehrenwörtliche Versicherung**

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 26.05.2006



---

Christian Eckert

Dissertation eingereicht am  
1. Gutachter  
2. Gutachter  
mündliche Prüfung am

26.05.2006  
Herr Prof. Dr. M. Biel  
Frau Prof. Dr. Vollmar  
23.06.2006



## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>12</b>
1.1	Der $I_h$	12
1.2	Die HCN-Kanäle als molekulare Grundlage des $I_h$	13
1.3	Struktur der HCN-Kanäle	13
1.3.1	Das S4-Segment als Spannungssensor	14
1.3.2	Die Porenregion	15
1.3.3	Die Zyklonukleotidbindungsdomäne	15
1.4	HCN-Kanäle bilden Tetramere	15
1.5	Die physiologische Rolle der einzelnen HCN-Kanäle	16
1.6	Modulation der HCN-Kanäle	17
1.6.1	Modulation durch den pH-Wert	17
1.6.2	Regulation durch die extrazelluläre $Cl^-$ -Konzentration	18
1.6.3	Modulation durch die Src-Kinase	18
1.6.3.1	Die Familie der Src-Kinasen	18
1.6.3.2	Strukturelle Komponenten der Src-Kinase	19
1.6.3.3	Die Aktivierung der Src-Kinase	20
1.6.4	Modulation durch zyklische Nukleotide	20
1.6.4.1	Die molekulare Wirkung von cAMP	22
<b>2.</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>23</b>
2.1	Regulation von HCN-Kanälen durch die Tyrosinkinase Src	23
2.2	Herstellung von Mauslinien mit cAMP-insensitiven HCN2- und HCN4-Kanälen	23
<b>3.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>25</b>
3.1	Chemikalien, Lösungen und Puffer	25
3.1.1	Standardlösungen	25
3.2	Protokolle zur Arbeit mit DNS	25
3.2.1	Amplifikation und Isolierung von Plasmiden	25
3.2.1.1	Verwendete Plasmide	25
3.2.1.2	Kultivierung von E.coli.	27
3.2.1.3	Transformation von E.coli	27
3.2.1.4	Alkalische Lyse – Schnelltest (Miniprep)	27
3.2.1.5	Alkalische Lyse (Maxiprep)	28
3.2.1.6	Isolation von genomischer DNS	28
3.2.1.7	Genomische DNS für Southern Blots	28
3.2.2	Reinigung von DNS	28
3.2.2.1	Phenol-Chloroform-Extraktion	28
3.2.2.2	DNS-Fällung	29
3.2.2.3	Elektroelution	29
3.2.2.4	GFX-Säulen	29
3.2.3	Enzymatische Modifikation von DNS	29
3.2.3.1	Restriktionsverdau	29
3.2.3.2	Phosphorylierung von DNS-Linkern	30
3.2.3.3	Dephosphorylierung von DNS-Fragmenten	30
3.2.3.4	Ligation von DNS-Fragmenten	30

3.2.4	Elektrophoretische Auftrennung und Isolierung von DNS aus Agarosegelen	30
3.2.4.1	Agarosegele	31
3.2.4.2	PAGE-Gele	31
3.2.5	Polymerase-Kettenreaktion	32
3.2.5.1	Fehlerkorrigierende PCR	33
3.2.5.2	Genotypisierung	33
3.2.5.3	Sequenzierung	34
3.2.6	Southern Blot	35
3.2.6.1	Gelelektrophorese	37
3.2.6.2	Blottingverfahren	37
3.2.6.3	Herstellung einer $^{32}\text{P}$ -markierten Gensonde	38
3.2.6.4	Hybridisierung	38
3.2.6.5	Rehybridisierung der Blots	39
<b>3.3</b>	<b>Protokolle zur Arbeit mit Protein</b>	<b>40</b>
3.3.1	Membranpräparation von Proteinen aus Maus-Geweben und HEK293-Zellen	40
3.3.2	Protein Isolation aus Gewebe	40
3.3.3	Quantifizierung von Proteinen	41
3.3.4	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE	41
3.3.4.1	Färben der Proteine im Gel	43
3.3.4.2	Western Blot	43
3.3.5	Koimmunpräzipitation	44
3.3.6	Expression und Aufreinigung von GST Fusionsproteinen	44
3.3.6.1	GST-Pull-Down-Versuche	45
<b>3.4</b>	<b>Kultur eukaryontischer Zellen</b>	<b>46</b>
3.4.1	Basismedium	46
3.4.2	Kultur von HEK293-Zellen	46
3.4.3	Kulturbedingungen	46
3.4.4	Transfektion von HEK-Zellen	46
<b>3.5</b>	<b>Kultur und genetische Modifikation (Gene Targeting) von murinen embryonalen Stammzellen</b>	<b>47</b>
3.5.1	Herkunft der Stammzellen	47
3.5.2	Kulturbedingungen	47
<b>3.6</b>	<b>Feederzellen</b>	<b>50</b>
3.6.1	Gewinnung embryonaler Fibroblasten	50
3.6.2	Kultivierung und Passagierung der Feederzellen	50
3.6.3	Bestrahlung von Feederzellen	51
3.6.4	Herstellung von Gefrierstocks aus Feederzellen	51
3.6.5	Auftauen der Feederzellen	51
<b>3.7</b>	<b>Primäres ES Zell Targeting</b>	<b>52</b>
3.7.1	Auftauen der Stammzellen	52
3.7.2	Splitten der ES-Zellen	52
3.7.3	Linearisierung des Targeting Vektors zur Elektroporation	52
3.7.4	Elektroporation von Stammzellen	52
3.7.5	Selektion rekombinierter Stammzellen	53
3.7.6	Isolation resistenter Klone	53
3.7.7	Herstellung von Gefrierstocks aus ES-Zellen	54
3.7.8	Analyse der resistenten Klone	54
<b>3.8</b>	<b>Sekundäres ES-Zell Targeting</b>	<b>55</b>

3.8.1	Auftauen und Kultivieren positiver Klone	55
3.8.2	Transiente Transfektion mit Cre-Plasmid	55
3.8.3	Negative Selektion mit Ganciclovir	56
<b>3.9</b>	<b>Erzeugung genetisch modifizierter Mäuse</b>	<b>57</b>
3.9.1	Verwendete Tiere	57
3.9.2	Vorbereitung der ausgewählten Klone	57
3.9.3	Gewinnung von Blastozysten	57
3.9.4	Erzeugung pseudoschwangerer Leihmütter	57
3.9.5	Injektion der Stammzellen in die Blastozysten	57
3.9.6	Verpaarung der Chimären	58
3.9.7	Mauszucht	58
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>59</b>
<b>4.1</b>	<b>Modulation des HCN2-Kanals durch die Src-Kinase</b>	<b>59</b>
4.1.1	HEK293 Zellen exprimieren endogen die Src-Kinase	59
4.1.2	Inhibierung der Src-Kinase verlangsamt die Aktivierungskinetik des HCN2-Kanals	59
4.1.3	Der HCN2-Kanal interagiert mit der Src-Kinase und wird phosphoryliert	60
4.1.4	Identifizierung der Interaktionsregion des HCN2-Kanals und der Src-Kinase	62
4.1.5	Die Src-Kinase reguliert den HCN2-Kanal durch die Phosphorylierung des Tyr <sup>476</sup>	64
4.1.6	Mutation des Tyr <sup>554</sup> im HCN4-Kanal	65
<b>4.2</b>	<b>Generierung von Mäusen mit cAMP-defizienten HCN2/HCN4-Kanälen</b>	<b>68</b>
4.2.1	Detektion der genomischen Sequenz des HCN2-Kanals	70
4.2.2	Erstellung des Targeting-Vektors für den HCN2-Kanal	73
4.2.3	Erstellung des Targeting-Vektors für den HCN4-Kanal	74
4.2.4	ES-Zell-Targeting	75
4.2.5	Primäres ES-Zell-Targeting	76
4.2.6	Southern Blots zum Nachweis der Rekombination	76
4.2.6.1	Analyse des HCN2cad-Stammzellen mit der HCN2-5'-Sonde	77
4.2.6.2	Analyse des HCN4cad-Stammzellen mit der HCN4-5'-Sonde	78
4.2.6.3	Analyse des HCN2cad-Stammzellen mit der HCN2-3'-Sonde	79
4.2.6.4	Analyse des HCN4cad-Stammzellen mit der HCN4-3'-Sonde	79
4.2.6.5	Analyse der HCN2cad- und HCN4cad-DNS mit der neo-tk-Sonde	80
4.2.6.6	Sequenzierung der integrierten Targeting-Vektoren	81
4.2.7	Sekundäres ES-Zell-Targeting	81
4.2.7.1	Southern Blot zum Nachweis der Cre-vermittelten Rekombination	82
4.2.7.2	PCR-Analyse zur Integration des Targeting-Vektors des HCN2- Kanals	83
4.2.8	Erzeugung der transgenen HCN2cad/neo-tk- und HCN4cad-Mauslinie	84
4.2.8.1	Injektion positiver HCN2cad/neo-tk- und HCN4cad-Klone	85

4.2.9	Nachweis der Mutation in der HCN2cad/neo-tk-Mauslinie	86
4.2.9.1	Nachweis durch PCR-Analyse	86
4.2.9.2	Nachweis durch Southern Blot	87
4.2.10	Verpaarung heterozygoter HCN2cad/neo-tk-Mäuse mit Cre-Deleter-Mäusen	88
4.2.11	PCR-Analyse zur Funktionalität der Cre-Rekombinase in HCN2cad/neo-tk-Mäusen	88
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>90</b>
5.1	Die Src-Kinase p60 <sup>c-Src</sup>	90
5.2	Vektorkonstruktion und Targeting für die HCN2cad- und HCN4cad-Mauslinien	92
5.2.1	Entfernung der neo-tk-Kassette im HCN2cad/neo-tk-Mäusen durch Verpaarung mit Cre-Deleter-Mäusen	93
5.2.2	Ausblick	94
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>96</b>
6.1	Modulation der HCN Kanäle durch die Src-Kinase	96
6.2	Erzeugung einer HCN2cad- und HCN4cad-Mauslinie	97
<b>7.</b>	<b>Anhang</b>	<b>99</b>
7.1	Verwendete Primer	99
7.2	Antikörper	101
6.2.1	Primäre Antikörper	101
6.2.2	Sekundäre Antikörper	101
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>103</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>107</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>108</b>





## Abkürzungen

APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin, bovine serum albumin
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
cDNS	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cGMP	zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat
CNBD	Zyklonukleotid-Bindungsdomäne
cpm	Zähler pro Minute, counts per minute
d	Tag
Da	Dalton
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dpm	Desintegrations per minute
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat (dATP, dCTP, dGTP und dTTP)
ddNTP	2',3'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat (ddATP, ddCTP, ddGTP und ddTTP)
dUTP	2'-Desoxyuridin-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
eGFP	enhanced green fluorescent protein
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
h	Stunde(n) / human
HRP	Meerrettichperoxidase, horseradish peroxidase
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid

---

IRES	Internal Ribosomal Entry Site
kb	Kilobasen, Einheit, 1000 Basenpaare
KI	knock-in
Ko-IP	Ko-Immunopräzipitation
LB	Luria-Bertani
LIF	Leukämie inhibierender Faktor
loxP	Erkennungssequenz der CRE-Rekombinase, locus of crossover (x) of Phage P
m	Minuten / von der Maus stammend
MCS	Multiple Klonierungsstelle, multiple cloning site
Mo	Monat
NaCl	Natriumchlorid
NaOAc	Natriumacetat
neo	Neomycinresistenz-Gen
nt	Nukleotid(e)
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gel
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCE	Phenol-Chloroform-Extraktion
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, polymerase chain reaction
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTK	Protein Tyrosin Kinase
RPM	Umdrehungen pro Minute, rounds per minute
RT	Raumtemperatur, Reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-Borat-NaCl-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	$\alpha,\alpha,\alpha$ -Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
U	Unit, Einheit

UV                      Ultraviolett

WT                     Wildtyp

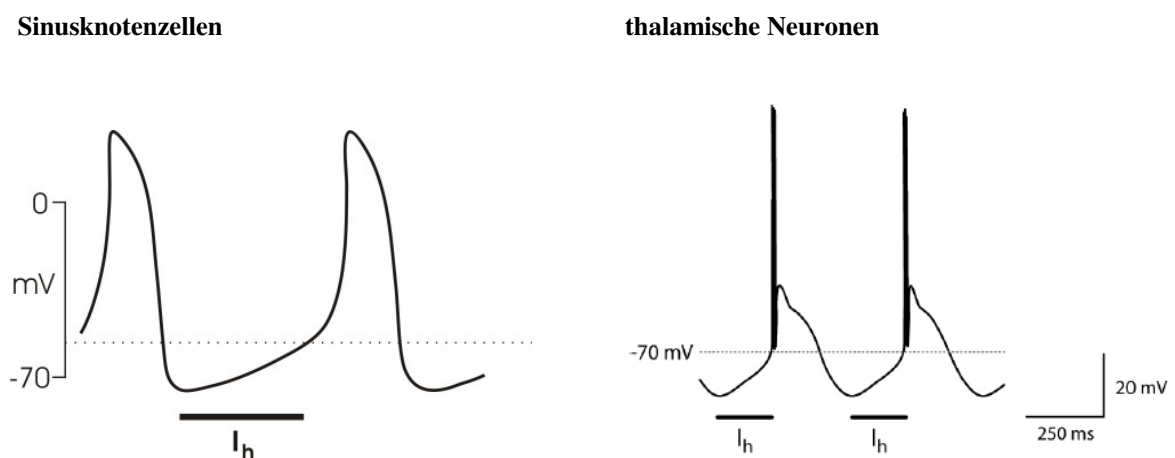
# 1. Einleitung

## 1.1 Der $I_h$

Für den Ablauf einer Vielzahl rhythmischer Prozesse, wie zum Beispiel dem Schlaf-/Wach-Rhythmus, der Atemfrequenz, der Hormonsekretion oder dem autonomen Herzschlag werden spezielle biologische Schrittmacher benötigt. Diese müssen in der Lage sein, eine periodische Abfolge von Aktionspotentialen (sog. Schrittmacherpotentiale) zu initiieren und zu steuern.

Mit dem  $I_h$  (h für hyperpolarisation activated, auch  $I_q$  für queer oder  $I_f$  für funny) in Kardiomyozyten, wurde ein Strom entdeckt (Brown et al. 1979), der die notwendigen Eigenschaften für einen biologischen Schrittmacher aufwies. Der  $I_h$  ist ein Kationen-Einwärtsstrom, der bei negativer Spannung aktiviert und durch intrazelluläres cAMP moduliert wird. Die bislang am besten untersuchte Funktion des  $I_h$  ist die Kontrolle des Herzrhythmus im Sinusknoten (Biel et al., 2002; Stieber et al., 2004).  $\beta$ -Rezeptor-Stimulation erhöht die intrazelluläre cAMP-Konzentration und führt so bei gleichem Potential zu einer Verschiebung der Amplitude, wodurch die diastolische Depolarisation beschleunigt und die Herzfrequenz erhöht wird. Vagale Stimulation führt durch eine Phosphodiesterase-vermittelte Erniedrigung des intrazellulären cAMP-Spiegels dagegen zu einer Verlangsamung der Frequenz.

Neben dem Herzen, konnte der  $I_h$  auch in einer Vielzahl von Neuronen im zentralen Nervensystem nachgewiesen werden (Luthi et al., 1998; Pape, 1996). Hier kodeterminiert er unter anderem die neuronale Integrität und die synaptische Plastizität oder kontrolliert als Schrittmacher die rhythmische Oszillation von Neuronen.



**Abbildung 1-1  $I_h$  in thalamischen Schrittmachernuronen und Sinusknotenzellen**

$I_h$  führt zu einer langsamen diastolischen Depolarisation bis zum Erreichen eines neuen Schwellenpotentials. Abb. Modifiziert nach Pape (1996) und Biel (2002).

## 1.2 Die HCN-Kanäle als molekulare Grundlage des $I_h$

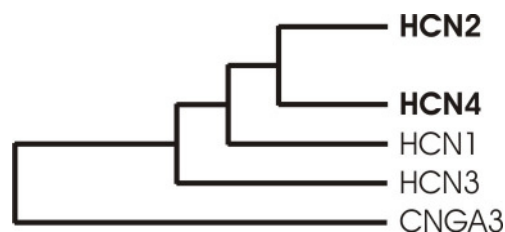
Ionen-Kanäle, die diesem  $I_h$ -Strom zugrunde liegen müssen speziellen Anforderungen genügen:

- im Gegensatz zu vielen anderen Ionenkanälen werden die  $I_h$ -Kanäle nicht bei Depolarisation sondern bei Hyperpolarisation der Zellmembran aktiviert. Die Halbmaximale Aktivierung ( $V_{0,5}$ ) liegt je nach Zelltyp zwischen  $-65$  und  $-95$  mV (Pape, 1996).
- es werden sowohl Kalium- als auch Natriumionen geleitet. Das relative Permeabilitätsverhältnis hängt von der extrazellulären  $K^+$ -Konzentration ab und beträgt dabei  $P_{Na}/P_K$  ca. 0,2-0,4 (Pape, 1996).
- die Kanäle werden durch cAMP und cGMP moduliert. Die Affinität zu cGMP ist jedoch 20-50fach niedriger als die zu cAMP.

Im Jahr 1998 konnten drei voneinander unabhängige Arbeitsgruppen cDNAs klonieren, die für  $I_h$ -Kanäle kodierten (Gauss et al., 1998; Ludwig et al., 1998; Santoro et al., 1997). Die funktionelle Expression dieser Gene ergab, dass es sich dabei um Kationen-Kanäle handelte, die bei Hyperpolarisation aktiviert und durch Zyklonukleotide moduliert wurden. Aufgrund ihrer Eigenschaften wurden sie HCN-Kanäle (**h**yperpolarisation-activated and **c**yclic **n**ucleotid-gated) genannt.

## 1.3 Struktur der HCN-Kanäle

Vier Isoformen der HCN-Kanäle konnten kloniert werden (HCN1-4). Diese gehören wie die CNG-Kanäle (**c**yclic **n**ucleotide-gated) zur Familie der spannungs-gesteuerten Kationen-Kanäle.

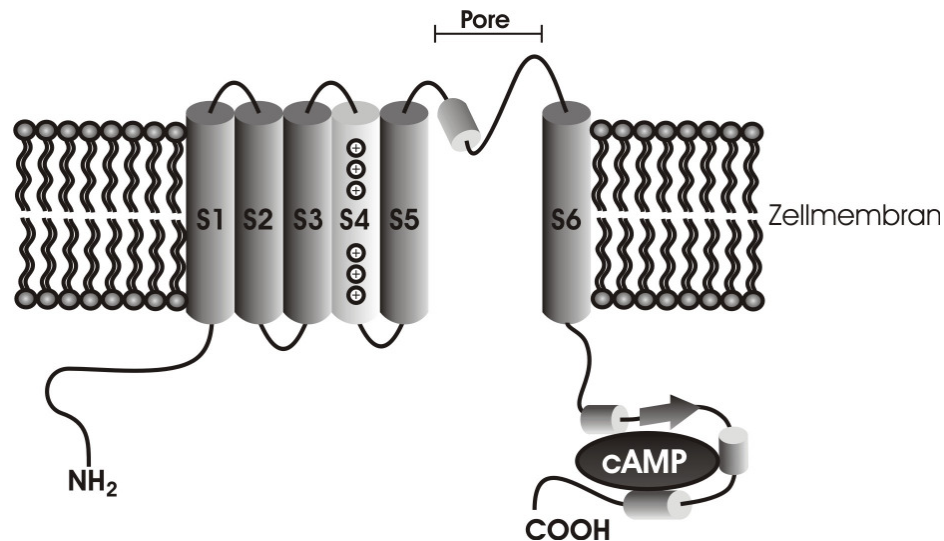


**Abbildung 1-2 Phylogenetischer Stammbaum**

HCN-Kanäle sind strukturell verwandt zu den zyklonukleotidgesteuerten Kanälen (CNGA3).

Wie spannungsabhängige Kaliumkanäle (Yellen, 2002) bestehen HCN-Kanäle aus sechs Transmembransegmenten (S1-S6), wobei das vierte Transmembransegment (S4) aufgrund seiner positiven Ladungen als Spannungssensor dient. Die typische Aminosäurensignatur des

Selektivitätsfilters für Kaliumkanäle ist -TVGYG-. Der Selektivitätsfilter der HCN-Kanäle hat die Sequenz -GYG-. Aufgrund dieser Änderung kann auch Natrium koordiniert werden. Die Pore der Kanäle liegt zwischen den Segmenten S5 und S6 (Abbildung 1-3). Sowohl das aminoterminal als auch das carboxyterminale Ende befindet sich intrazellulär. Am C-Terminus befindet sich eine Zyklonukleotidbindungstasche (CNBD), die wie bei den CNG-Kanälen durch den C-Linker vom S6-Segment getrennt ist (Zong et al., 1998). Die verschiedenen HCN-Isoformen zeigen untereinander eine Sequenz-Homologie von 60%. Dabei ist die Homologie in der zentralen Transmembranregion und der CNBD mit 80-90% am höchsten. Die C- und N-Termini variieren in ihrer Länge und zeigen nur geringe Homologie.



**Abbildung 1-2 Schematische Darstellung der Struktur der HCN-Kanäle**

HCN-Kanäle besitzen 6 Transmembransegmente. Das vierte Segment stellt den Spannungssensor dar, zwischen Segment fünf und sechs befindet sich die Porenregion. Am C-terminalen Ende liegt die Zyklonukleotidbindungsdomäne (CNBD).

### 1.3.1 Das S4-Segment als Spannungssensor

Spannungsabhängige Kaliumkanäle leiten Kaliumionen durch die Zellmembran aufgrund von Änderungen des Membranpotentials. Das S4-Segment stellt dabei den Spannungssensor dar. Das S4 der HCN-Kanäle zeigt in seiner Sequenz positive Aminosäurereste an jeder dritten Position. Dadurch wird der Spannungssensor je nach Polarität der Zellmembran in Richtung zum Zelläußeren (bei Depolarisation) bzw. zum Zytosol (bei Hyperpolarisation) hin bewegt. Bei depolarisationsaktivierten Kanälen schließt eine Hyperpolarisation, also die Einwärtsbewegung des S4-Segments, den Kanal. Auch bei hyperpolarisationsaktivierten

HCN-Kanäle führt eine Hyperpolarisation der Zellmembran zu einer Bewegung des Spannungssensors in Richtung des Zytosols. Jedoch öffnen die  $I_h$ -Kanäle bei dieser Bewegung (Mannikko et al., 2002). Durch den S4-S5-Linker, einer  $\alpha$ -Helix, die im Inneren der Zelle parallel zur Membran verläuft, wird die Bewegung des S4 Segments auf das S6-Transmembransegment übertragen.

### 1.3.2 Die Porenregion

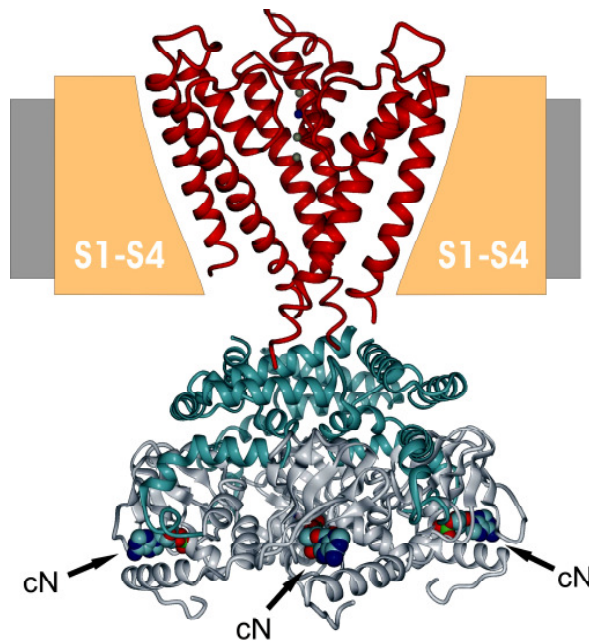
Zwischen dem fünften und sechsten Segment der HCN-Kanäle liegt die Porenregion mit einer für Kalium-Kanäle typischen hochkonservierten Aminosäuresequenz, dem GYG-Motiv. Dieses stellt den Selektivitätsfilter für  $K^+$ -Kanäle dar. Durch Carbonyl-Sauerstoff-Atome in der Filterregion, die in die Pore ragen, werden die dehydratisierten Ionen koordiniert. Für HCN-Kanäle ist die Selektivität niedriger, da sie auch Natriumionen leiten. Da die Kanäle in der Lage sein müssen, bei Hyperpolarisation Ströme zu leiten, ist dies wichtig, denn bei Potentialen negativer als  $-20\text{mV}$  ist nur noch ein Nettoeinwärtsstrom möglich.

### 1.3.3 Die Zyklonukleotidbindungsdomäne (CNBD)

Die CNBD der HCN-Kanäle ist eine autoinhibitorische Domäne, d.h. sie interagiert in Abwesenheit von cAMP mit der Porenregion und erschwert so die spannungsabhängige Öffnung. Eine Erhöhung des cAMP-Spiegels hebt diese Inhibierung auf. Dies konnte anhand von CNBD/C-Linker-Deletionsmutanten gezeigt werden, die den gleichen Effekt auf den  $I_h$ -Strom hatten wie eine sättigende Konzentration von cAMP (Wainger et al., 2001).

## 1.4 HCN-Kanäle bilden Tetramere

Die Kristallstruktur des carboxyterminalen Fragments (CNBD und C-Linker) des HCN2-Kanals (Zagotta et al., 2003) zeigt die Zusammenlagerung von vier Monomeren. Auch die kristallisierten Proteine der spannungsabhängigen Kaliumkanäle KcsA (Doyle et al., 1998), KvAP (Jiang et al., 2003b), MthK (Jiang et al., 2003a) und des Kv1.2 (Long et al. 2005) bestätigen das zuvor postulierte Modell einer Tetramerisierung der HCN-Kanäle. Da eine große Homologie zwischen diesen Kaliumkanälen und den HCN-Kanälen besteht, kann diese Struktur auch für die Schrittmacherkanäle angenommen werden. Es gibt mehrere Hinweise, dass sich auch Heterotetramere aus verschiedenen HCN-Isoformen bilden können (Chen et al., 2001; Much et al., 2003; Ulens and Tytgat, 2001; Xue et al., 2002). Ein weiterer Anhaltspunkt dafür ist die mittlerweile belegte Heterotetramerisierung von CNG-Kanälen (Matulef and Zagotta, 2003).



**Abbildung 1-5 Putatives Model eines HCN-Kanals**

Das Bild der Kristallstruktur ist aus dem carboxyterminalen Fragment des HCN2-Kanals und den Transmembransegmenten des KcsA-Kanals zusammengesetzt. Man sieht drei der vier Untereinheiten des putativen Kanals.

### 1.5 Die physiologische Rolle der einzelnen HCN-Kanäle

Die spezifischen Funktionen der einzelnen Kanäle (HCN1-4) der HCN-Familie konnten vor allem aufgrund der Untersuchungen an Gen-defizienten Mauslinien aufgeklärt werden (HCN1: (Nolan et al., 2003) HCN2: (Ludwig et al., 2003) HCN4: (Stieber et al., 2003)). In Tabelle 1-1 sind die wichtigsten Merkmale und Eigenschaften, wie z.B. das Expressionsmuster der HCN-Kanäle, zusammengefasst.



	HCN1	HCN2	HCN3	HCN4
<b>Expressionsmuster</b>	zentrale und periphere Neuronen (Hippocampus, Cerebellum, Neocortex, Photorezeptoren), Sinusknoten	zentrale und periphere Neuronen, Retina, Herzzellen	Gehirn, Retina, Herz	Thalamus, Retina, olfaktorischer Bulbus, Sinusknoten, Testes, Geschmackszellen
<b>Aktivierung</b>				
$V_{0,5}$	-70 mV bis -90 mV	-75 mV bis -100 mV	-95 mV	-65 mV bis -100 mV
$\tau_a$	30-300 ms bei -140 mV bis -95 mV	180-600 ms bei -140 mV bis -100 mV	260 ms bei -140 mV	260 ms -30 s bei -140 mV bis -70 mV
<b>Aktivatoren</b>	cAMP > cGMP +2 mV bis +7 mV	cAMP > cGMP + 15 mV	cAMP > cGMP - 5 mV	cAMP > cGMP +10 mV bis +25 mV
<b>physiologische Funktion</b>	motorisches Lernen, räumliches Gedächtnis, Modulation der retinalen Lichtantwort	Ruhemembranpotential von Neuronen und kardialen Schrittmacherzellen, Modulation der Feuerfrequenz von thalamischen Neuronen	noch nicht untersucht	Entwicklung kardialer Schrittmacherzellen, Herzfrequenzkontrolle, saurer Geschmack
<b>Phänotypen bei Knock-out Modellen</b>	Defizit im motorischen Lernen	kardialer und neuronaler Phänotyp	kardialer Phänotyp	lethal bereits in der Embryonalentwicklung (Tag 10,5)
<b>Blocker</b>	Ivabradin, Zatebradin, Cs <sup>+</sup> , ZD7288, Cilobradin	Ivabradin, Zatebradin, Cs <sup>+</sup> , ZD7288, Cilobradin	keine	Ivabradin, Zatebradin, Cs <sup>+</sup> , ZD7288, Cilobradin

Tabelle 1-1 Eigenschaften der HCN-Kanäle

## 1.6 Modulation der HCN-Kanäle

### 1.6.1 Modulation durch den pH-Wert

Eine wichtiger Modulator von HCN-Kanälen ist der intrazelluläre pH-Wert (Munsch and Pape, 1999). Mit Erniedrigung des pH-Wertes wird die Öffnungsgeschwindigkeit verlangsamt und verschiebt sich die Aktivierungskurve zu negativeren Potentialen. Hauptsächlich verantwortlich für diese pH-Sensitivität ist ein konserviertes Histidin am intrazellulären Ende des Spannungssensors (His<sup>321</sup> im HCN2-Kanal, (Zong et al., 2001)). Diese Art der Modulation könnte bei einer Vielzahl von physiologischen Prozessen beteiligt sein, wie z.B. an thalamischen Oszillationen oder an der Regulation der Atemfrequenz. Im Gegensatz zu den intrazellulären Effekten bewirkt ein stark saurer extrazellulärer pH-Wert (pH<5,0) eine Aktivierung des Kanals ( $V_{0,5}$ : +30 mV).

### 1.6.2 Regulation durch die extrazelluläre $\text{Cl}^-$ -Konzentration

Weiterhin spielt die Regulation der HCN-Kanäle durch extrazelluläre Ionen eine zentrale Rolle bei der Kontrolle der Herzfunktionen. Es konnte gezeigt werden, dass der sinoatriale  $\text{I}_h$ -Strom durch die extrazelluläre  $\text{Cl}^-$ -Konzentration reguliert wird (Wahl-Schott et al., 2005). Dabei stellte sich heraus, dass der HCN2- und HCN4-Kanal die gleiche  $\text{Cl}^-$ -Abhängigkeit zeigen wie der sinoatriale  $\text{I}_h$ -Strom. Bei Abwesenheit von extrazellulären  $\text{Cl}^-$  ist dieser um 90% reduziert. Der neuronale HCN1-Strom nimmt bei gleichen Versuchsbedingungen nur etwa 50% ab. Diese Reduktion des  $\text{I}_f$  liegt an der verminderten Kanal-Leitfähigkeit, da weder die Strom-Abhängigkeit noch die Ionenselektivität beeinflusst wird. Für diese  $\text{Cl}^-$ -Abhängigkeit sind zwei zentrale Aminosäuren in der Pore verantwortlich, F389 und R405 im HCN2-Kanal, im Gegensatz zu Y336 und A352 im HCN1-Kanal. Es wird vermutet, dass die Bindung von  $\text{Cl}^-$ -Ionen eine Inhibierung löst, die im HCN2-Kanal stärker ist als im HCN1-Kanal.

### 1.6.3 Modulation durch die Src-Kinase

Während man über die zelluläre Regulation der HCN-Kanäle noch wenig weiß, ist bekannt, dass Hormone und Neurotransmitter in der Lage sind, über G-Protein gekoppelte cAMP-Konzentrationsänderungen die Kanäle zu modulieren (Pape, 1996). Im Gegensatz zu vielen anderen Ionenkanälen beinhaltet die Modulation der Kanäle durch eine Erhöhung der cAMP-Konzentration nicht die Protein-Kinase A vermittelte Serin- oder Threonin-Phosphorylierung (DiFrancesco and Tortora, 1991). Kinasen der Src-Familie sind in der Lage, mit den Kanälen zu interagieren (Santoro et al., 1997) und diese eventuell zu regulieren (Pape, 1996). Eine Interaktion des HCN1-Kanals konnte durch einen „Yeast-Two-Hybrid-Screen“, bei dem die SH3-domäne der n-Src-Kinase (neuronale Splicevariante der Src-Kinase mit 6- bzw. 11-Aminosäureinsertionen) als „Bait“ verwendet wurde, gezeigt werden. Allerdings wurde nicht untersucht, ob diese Interaktion auch in nativem Gewebe auftritt und wenn, in welcher Weise die n-Src-Kinase den Kanal beeinflusst.

#### 1.6.3.1 Die Familie der Src-Kinasen

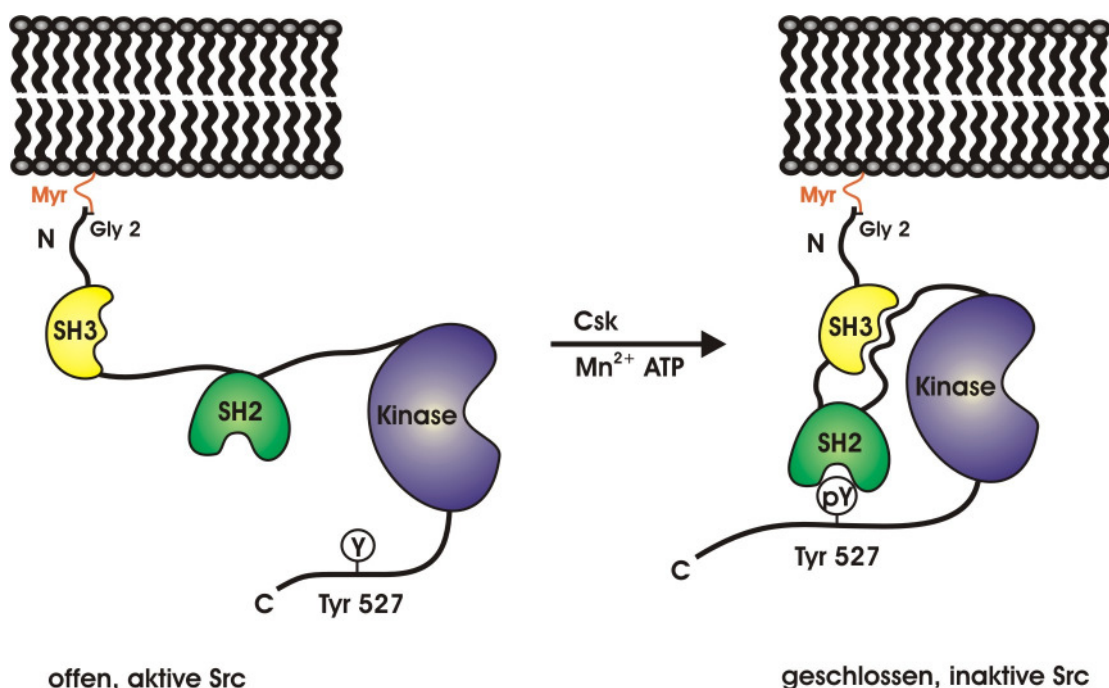
Die src-Genfamilie kodiert für zytoplasmatische Protein-Thyrosin-Kinasen (PTKs), die für die Weiterleitung und Verstärkung von extrazellulären Signalen in der Zelle verantwortlich sind. Zu dieser Familie zählen neben der  $\text{p60}^{\text{c-Src}}$  noch mindestens acht weitere Mitglieder, wie z.B.  $\text{p56}^{\text{blk}}$ ,  $\text{p58}^{\text{c-fgr}}$ ,  $\text{p53}^{\text{lyn}}$  oder  $\text{p59}^{\text{fyn}}$  (Hughes, 1996).

### 1.6.3.2 Strukturelle Komponenten der Src-Kinase

Die Src-Protein-Tyrosin-Kinasen bestehen aus drei Domänen, den Src-Homologie-Domänen SH1, SH2 und SH3, welche auch in vielen anderen Signal-Proteinen gefunden wurden. Dabei besitzt die SH1-Domäne die PTK-Aktivität, während die SH2- und SH3-Domänen bei Protein-Protein-Interaktionen eine wichtige Rolle spielen, indem sie an Phospho-Tyrosin beinhaltende Prolin-reiche Motive binden.

Obwohl sich die aminoterminal Region der Src-Familie stark unterscheidet, besitzen alle Mitglieder dieser Familie in der Aminosäuresequenz einen Glycin-Rest an der Position zwei. Dieser ist notwendig für die Myrestylierung (Resh, 1990) der PTKs, wodurch sie an die innere Zellmembran oder an andere zytoplasmatische Membranen rekrutiert werden können, was für ihre Funktion wichtig ist.

Die SH1-Domäne, mit etwa 260 Aminosäuren, ist der katalytisch aktive Bereich der PTKs ( $p60^{c-Src}$ : Reste 260 bis 516). Sie katalysiert die Phosphorylierung von Tyrosin-Resten in den Ziel-Proteinen. Diese Region ist nicht einheitlich hoch konserviert, sondern enthält vielmehr alternierende Bereiche hoher und weniger hoher Homologien (Hanks et al. 1988). Die SH3-Domäne der  $p60^{c-Src}$  erstreckt sich über die Aminosäuren 86 bis 136, an die von den Resten 137 bis 241 unmittelbar die SH2-Domäne anschließt.



**Abbildung 1-6 Die Phosphorylierung von Tyr<sup>527</sup> induziert eine Konformationsänderung der Src**  
Durch die Phosphorylierung des Tyr<sup>527</sup> durch Csk-Kinase, geht die Src-Kinase in eine geschlossene inaktive Konformation über.

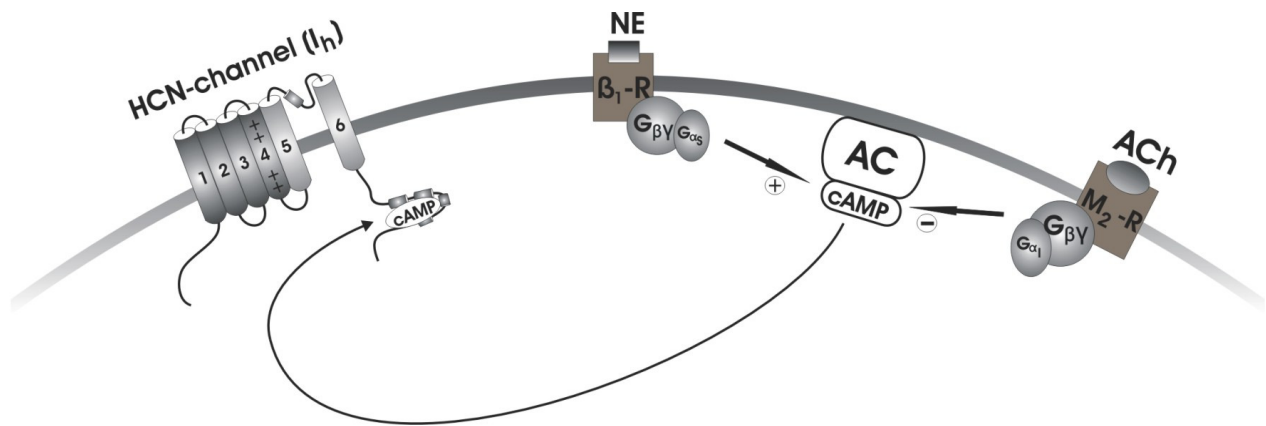
### 1.6.3.3 Die Aktivierung der Src-Kinase

Die Aktivierung der Src-Kinase wird hauptsächlich durch den C-terminalen Bereich des Proteins kontrolliert. Untersuchungen an der Src-Kinase des Huhns haben gezeigt, dass das Tyr<sup>527</sup> durch eine weitere zytoplasmatische Tyrosin-Kinase Csk phosphoryliert wird und die Src-Kinase in die inaktive, geschlossene Konformation übergeht. Dabei interagiert das phosphorylierte Tyrosin 527 mit der SH2-Domäne und hemmt so die Kinase-Aktivität (Abbildung 1-6).

### 1.6.4 Modulation durch zyklische Nukleotide

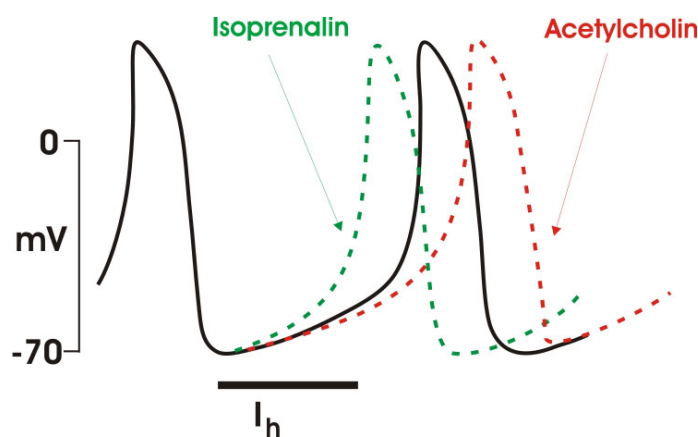
Die Modulation durch zyklische Nukleotide beruht auf einer direkten Interaktion des cAMP mit der Zyklonukleotidbindungsdomäne der Schrittmacherkanäle (DiFrancesco and Mangoni, 1994). Außer durch cAMP wird I<sub>h</sub> auch noch durch andere zyklische Nukleotide moduliert, cGMP oder cCMP erreichen jedoch erst bei ca. 50-fach höheren Konzentrationen die Affinität von cAMP (K<sub>a</sub>-Werte für halbmaximale Verschiebung der Aktivierungskurve: cAMP: 0,2 µM, cGMP: 8 µM, cCMP: 12 µM; (DiFrancesco and Tortora, 1991)).

Die intrazelluläre Antwort vieler verschiedener Hormone und Neurotransmitter wird durch cAMP als sogenanntem „second messenger“ vermittelt. Die Stimulation von β-Adrenozeptoren, serotonergen oder histaminergen Rezeptoren führt durch die Aktivierung der Adenylatzyklase zu einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels. Im Gegensatz dazu führt eine Stimulation muskarinischer Acetylcholinrezeptoren, A<sub>1</sub>- und µ-Opioid-Rezeptoren zu einer Absenkung des cAMP-Spiegels.



#### Abbildung 1-7 Modulation der HCN-Kanäle durch cAMP

Die schematische Darstellung veranschaulicht die Modulation des HCN-Kanals durch Erhöhung und Erniedrigung des cAMP Spiegels. AC: Adenylatcyclase;  $\beta_1$ -R: adrenerger Rezeptor Typ  $\beta_1$ ;  $G_{\alpha_i}$ :  $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins (inhibiert AC);  $G_{\alpha_s}$ :  $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins (stimuliert AC);  $G_{\beta\gamma}$ :  $\beta\gamma$  Untereinheit des G-Proteins.



#### Abbildung 1-8 Modulation von $I_h$

Schrittmacherpotential im Sinusknoten unter Kontrollbedingungen (schwarz), nach  $\beta$ -adrenerger Stimulation durch Isoprenalin (grün) und nach Stimulation durch Acetylcholin (rot).

Die direkte Bindung von cAMP am carboxyterminalen, zytoplasmatischen Teil der HCN-Kanäle, der Zyklonukleotidbindungsdomäne (CNBD), hat eine schnellere und vollständigere Öffnung des Kanals nach der Repolarisation zur Folge. Dadurch wird die Aktivierungskinetik sowohl von nativen als auch klonierten HCN-Kanälen beschleunigt (Ludwig et al., 1998; Wang et al., 2001).

Die verschiedenen Isoformen der Kanäle werden unterschiedlich stark durch zyklische Nukleotide moduliert (Abbildung 1-9). Für den HCN2-Kanal (12-14 mV; (Ludwig et al., 1999; Ludwig et al., 1998) und den HCN4-Kanal (11-23 mV; (Ishii et al., 1999; Ludwig et al.,

1999; Seifert et al., 1999)) ist die Verschiebung von  $\Delta V_{0,5}$  durch cAMP am deutlichsten, während der HCN1-Kanal ( 2-5,8 mV (Santoro and Tibbs, 1999; Wainger et al., 2001)) nur minimal durch cAMP beeinflusst wird.  $\Delta V_{0,5}$  des HCN3-Kanals wird durch cAMP negativer (-5mV ((Mistrik et al., 2005)).

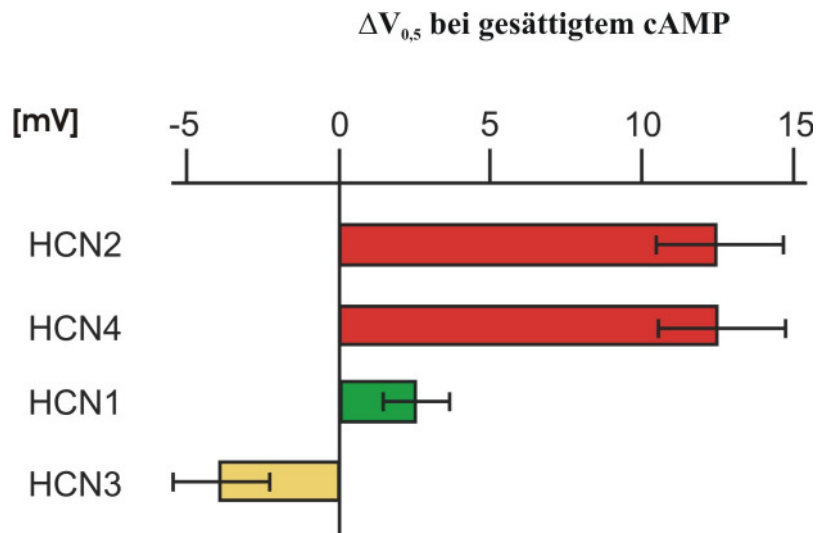


Abbildung 1-9 cAMP-abhängige Veränderung von  $\Delta V_{0,5}$  der vier HCN-Kanäle

#### 1.6.4.1 Die molekulare Wirkung von cAMP

Untersuchungen an trunkierten HCN-Kanälen haben gezeigt, dass die molekulare Wirkung von cAMP bei der Aktivierung von HCN-Kanäle auf eine inhibitorischen Wirkung einer  $\beta$ -Faltblatt-Untereinheit der CNBD beruht (Wainger et al., 2001). In Abwesenheit von cAMP interagiert der C-terminale Teil mit der Kernregion des Kanals und verschiebt so die Aktivierung in Richtung hyperpolarisierender Membranpotentiale. Da jedoch die Aktivierung der HCN-Kanäle ein allosterischer Prozess ist, der aus zwei Komponenten besteht, der Spannungsabhängigkeit und der Modulation durch Zyklonukleotide, kann die physiologische cAMP-Wirkung nicht ohne Einfluss der Spannungsabhängigkeit untersucht werden.

## 2. Zielsetzung

### 2.1 Regulation von HCN-Kanälen durch die Tyrosinkinase Src

Bisher existieren nur sehr wenige Befunde zur zellulären Modulation von HCN-Kanälen. Insbesondere ist unklar, ob HCN-Kanäle in Analogie zu den meisten bekannten Ionenkanälen durch Proteinphosphorylierung beeinflusst werden können. Es gab jedoch erste Hinweise darauf, dass ein Mitglied der Tyrosinkinasenfamilie, Src, ein möglicher Regulator von HCN-Kanälen sein könnte. Hierfür sprach, dass die Src-Kinase in einem Hefesystem an den HCN1-Kanal binden kann und dass pharmakologische Blocker der Src-Kinase, wie z.B. Genistein, HCN-Kanal-vermittelte Ströme zu inhibieren scheinen. Ziel dieser Arbeit war es, zu überprüfen, ob die Src-Kinase *in vivo* ein Regulator von HCN-Kanälen ist. Im Rahmen dieser Fragestellung sollten die molekularen Determinanten einer möglichen Interaktion zwischen HCN-Kanälen und der Src-Kinase bestimmt werden, Phosphorylierungsstellen identifiziert werden, und schließlich analysiert werden, welche Auswirkung die Phosphorylierung von Tyrosinresten auf Stromeigenschaften von HCN-Kanälen hat

### 2.2 Herstellung von Mauslinien mit cAMP-insensitiven HCN2- und HCN4-Kanälen

Die Aktivierung von HCN-Kanälen ist ein komplexer allosterischer Prozess, der eine Spannungs- und eine Liganden (cAMP)-abhängige Komponente beinhaltet. Aufgrund der intrinsischen Verknüpfung beider Komponenten ist es in nativen Kanälen nicht ohne weiteres möglich, die cAMP-abhängige Regulation zu untersuchen ohne störenden Einflüssen durch die spannungsabhängige Aktivierung zu unterliegen. Eine Möglichkeit, dieses Problem experimentell anzugehen ist es, HCN-Kanalmutanten zu erzeugen, deren Affinität zu cAMP soweit reduziert ist, dass sie rein spannungsabhängig aktiviert werden. Solche Mutanten wurden bereits in der Vergangenheit erfolgreich für den HCN2- und HCN4-Kanal konstruiert und im heterologen Expressionssystem analysiert. Ziel dieser Arbeit war es nun, die entsprechenden Mutationen im Mausgenom durch Gentergeting zu etablieren, um somit langfristig Mauslinien zu erzeugen, deren  $I_h$ -Ströme cAMP insensitiv sind. Anhand dieser Mauslinien kann dann *in vivo* die physiologische Relevanz der Ansteuerung von  $I_h$  durch cAMP bestimmt werden.





### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Chemikalien, Lösungen und Puffer

Soweit nicht anders vermerkt, wurden Chemikalien von den Firmen Roth, Merck, Biorad oder Sigma-Aldrich in den Qualitäten „für molekularbiologische Zwecke“ oder „pro analysi“ bezogen. Restriktionsenzyme und andere DNS modifizierende Enzyme wurden von Promega, Biolabs oder New England Biolabs (NEB) verwendet. Zur Herstellung sämtlicher Lösungen wurde sterilfiltriertes, hochreines Wasser (Easypure UV/UF, Barnstead) benutzt. Lösungen, die für kritische Anwendungen (z.B. PCR, RNS-Methoden) bestimmt waren oder über längere Zeit verwendet werden sollten, wurden autoklaviert.

##### 3.1.1 Standardlösungen

Standardlösungen wie PBS, TAE, DNS-Probeauftragspuffer oder SDS-PAGE Lauf- und Probenpuffer wurden nach den Angaben in Sambrook und Russel (2001) hergestellt.

Der AM-X-Puffer setzte sich wie folgt zusammen:

20	mM	Tris-HCl (pH 7.9)
5	mM	MgCl <sub>2</sub>
0,2	mM	EDTA
x	mM	DTE
20%		Glycerin

Die Zusammensetzung weiterer, spezieller Puffer-Angaben ist bei den jeweiligen Methoden beschrieben.

#### 3.2 Protokolle zur Arbeit mit DNS

##### 3.2.1 Amplifikation und Isolierung von Plasmiden

###### 3.2.1.1 Verwendete Plasmide

###### pUC18 (Pharmacia)

pUC18 ist ein Klonierungsvektor, dessen multiple Klonierungsstelle (MCS) innerhalb der kodierenden Sequenz des  $\alpha$ -Peptids der  $\beta$ -Galaktosidase liegt. Werden E.coli-Stämme, deren

lacZ-Gen (für die  $\beta$ -Galactosidase kodierend) zerstört ist (z.B. XL1-Blue von Stratagene), mit diesem Plasmid transformiert, lässt sich auf einem entsprechenden Agar eine Blau/Weiß-Selektion auf Einbau von Fremd-DNS durchführen. Der pUC18 ist ein „high-copy“ Plasmid, welches in der Bakterienzelle in vielen Kopien vorliegt.

### **pBluescript II KS – (Stratagene)**

Der pBluescript (Stratagene) Vektor entspricht dem pUC18 als Klonierungsvektor, besitzt jedoch eine MCS mit einer größeren Auswahl an Restriktionsstellen. Der Vektor besitzt ebenfalls ein Ampicillinresistenzgen, den E. coli-Replikationsursprung und das Gen für das  $\alpha$ -Peptid der  $\beta$ -Galaktosidase.

### **pBSloxPneoTKloxP**

Ausgehend vom pBluescript KS- wurden zwei als Selektionsmarker verwendete Gene in dessen MCS integriert. Diese werden von zwei gleichgerichteten loxP-Sequenzen flankiert („gefloxt neo-tk-Kassette“). Die Neomycinphospho-Transferase (neo) dient als positiver Selektionsmarker. Dessen Expression lässt Kolonien eukaryontischer Zellen in G418-haltigen Medium überleben. Im Gegensatz dazu ist die Thymidinkinase (tk) ein negativer Marker. Wird sie exprimiert, sterben Kolonien, die in einem Medium kultiviert werden, das das Nucleosidanalogon Ganciclovir enthält.

### **pIRES-eGFP**

Der pIRES-eGFP ist ein bizistronischer Vektor, von dem das über die MCS integrierte Gen und das verstärkte GFP transkribiert werden kann. Da diese beiden Gene über eine IRES-Sequenz verbunden sind, entstehen nach der Translation zwei unabhängige Proteine, also kein Fusionsprotein.

### **pcDNA3.1**

pcDNA3.1 (Invitrogen) dient als Expressionsvektor. Er kann in E. coli vermehrt und in eukaryoten Zellen zur heterologen Expression von rekombinanten Proteinen verwendet werden. Der Cytomegalievirus-Promotor sorgt für eine starke Transkription der insertierten cDNA. Die Stabilität der transkribierten RNA wird durch ein Polyadenylierungssignal (aus dem Wachstumshormonen des Rindes) verbessert.

### 3.2.1.2 Kultivierung von E.coli

Verwendet wurde der Stamm XL1-Blue MRF' (Stratagene). Mit diesem Stamm lässt sich zusätzlich eine Blau/Weiß-Selektionierung in mit X-Gal supplementiertem Medium durchführen (2.1.1.1). Weitere Mutationen sorgen für die Stabilität der zu amplifizierenden Vektoren.

Die Kultivierung von E.coli erfolgte in mit Glucose angereichertem Luria-Bertani (LB) Nährmedium (LB+). Das Medium wurde entweder für Flüssigkulturen oder, nach Zusatz von Agar, fest in Petrischalen verwendet. Zur Selektion der mit Plasmiden transformierten Bakterienkolonien wurde das jeweilige Antibiotikum zugesetzt, dessen Resistenzgen auf dem Plasmid kodiert ist. Bis auf pIRES (Kanamycin) enthielten alle hier verwendeten Plasmide ein  $\beta$ -Laktamasegen, das Ampicillinresistenz verleiht. Die Flüssigkulturen wurden bei 37°C und 225 rpm geschüttelt und auf Agarplatten bei 37°C im Trockenschrank über Nacht inkubiert. Die Agarplatten konnten für mehrere Wochen bei 4°C gelagert werden. Zur Erhaltung von Flüssigkulturen wurde ein Teil der Kultur mit sterilem Glycerol 85% 1:1 gemischt und bei -80°C eingelagert.

#### Luria-Bertani Medium + Glucose

Pepton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
Glucose	1 g
H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
pH 7,2 – 7,5	

#### Luria-Bertani Agar + Glucose

Pepton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
Glucose	1 g
Agar	15 g
H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
pH 7,2 – 7,5	

### 3.2.1.3 Transformation von E.coli

Transformation bezeichnet das Einbringen fremder DNS in Bakterien. Zyklische Plasmide mit einem eigenem Replikationsursprung, der von bakteriellen DNS-Polymerasen erkannt wird, werden in der Zelle vervielfältigt und bei der Zellteilung auf die Tochterzellen verteilt. Aufgrund des Antibiotikums im Medium kommt es zu einem Selektionsdruck zu Gunsten des gewünschten Plasmids.

### 3.2.1.4 Alkalische Lyse – Schnelltest (Miniprep)

Die Isolierung von Plasmid-DNA durch Minipräparation wurde nach dem Protokoll der alkalischen Lyse nach Sambrook und Russell (2001) durchgeführt.

Die erhaltene, noch leicht verunreinigte DNS wurde zur Kontrolle der richtigen Transformation mittels Restriktionsverdau oder Sequenzierung überprüft.

### **3.2.1.5 Alkalische Lyse (Maxiprep)**

Für die Isolierung von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab wurden 200 ml einer Übernachtskultur des entsprechenden rekombinanten Bakterienklons eingesetzt. Die Isolierung erfolgte auf Basis des Protokolls zur Plasmidisolierung durch alkalische Lyse (Sambrook und Russell, 2001). Es wurden Plasmid-DNA-Reinigungssäulen und der Maxi-Präparationskit der Firma Qiagen verwendet und nach Vorschriften des Herstellers vorgegangen (Plasmid Purification Handbook, Qiagen).

### **3.2.1.6 Isolation von genomischer DNS**

Das zu genotypisierende Gewebe wurde in 1,5 ml Eppendorfgefäßen in 98 µl 1x PCR-Puffer und 2 µl Proteinase K (20 mg/ml, Roche oder Roth) bei 55 °C in einem Thermomixer (Eppendorf) mit 600 rpm 3 bis 12 Stunden verdaut. Anschließend wurde die Probe für 15 min auf 95 °C erhitzt, um so die Proteinase K zu inaktivieren. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

### **3.2.1.7 Genomische DNS für Southern Blots**

Um DNS für Southern Blots zu gewinnen, wurden Gewebeproben oder Zellen mit Proteinase K (finale Konzentration 80 µg/µl) über Nacht bei 55°C in einem Thermomixer (Eppendorf) mit 600 rpm oder in einem Trockenschrank (bei Stammzellen auf 96 well-Platten) über Nacht inkubiert.

<u>Lysepuffer</u>	
Tris-Cl (pH 8.0)	20 mM
EDTA (pH 8.0)	5 mM
NaCl	400 mM
SDS	1 % (w/v)

## **3.2.2 Reinigung von DNS**

### **3.2.2.1 Phenol-Chloroform-Extraktion**

Die Extraktion entfernt Proteine aus der wässrigen Lösung. Die zu extrahierende Lösung wurde mit demselben Volumen einer Mischung aus Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol (25:24:1, Roth) kräftig geschüttelt und bei 13000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Die

wässrige obere Phase, welche die DNS enthält, wurde in ein neues Gefäß überführt und nochmals im selben Volumen Chloroform geschüttelt, um Reste an Phenol aus der Wasserphase zu entfernen. Die DNS wurde mit Ethanol gefällt (1.2.2.2).

### **3.2.2.2 DNS-Fällung**

Zur Aufreinigung oder Aufkonzentrierung wurde die DNS mit Ethanol gefällt (Sambrook 2001). Eine wässrige DNS-Lösung wurde mit 1/10 Volumen 5 M Natriumacetat und dem zweieinhalbfachen Volumen Ethanol (100 %) gemischt. Nach 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur entstand eine DNS-Flocke, die bei 13000 rpm und 4 °C für 15 Minuten pelletiert wurde. Bei kleineren DNS-Fragmenten (< 400 Basenpaare) wurde die Inkubation bei -80 °C für 1 Stunde durchgeführt. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation (13000 rpm, 4 °C, 5 Minuten) und Dekantieren des Überstandes wurde das Pellet in einer Vakuumzentrifuge (SpeedVac) für 10-15 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und in wenig Wasser wieder aufgenommen.

Alternativ ist eine Fällung mit Isopropanol im Verhältnis 1:1 möglich. Nach der Zentrifugation wird die DNS mit 70 % Ethanol gewaschen.

### **3.2.2.3 Elektroelution**

Um DNS aus einem präparativen PAGE-Gel zu isolieren, wurde die Bande unter UV-Licht ausgeschnitten und mit 300 µl 1xTBE in einen DNS zurückhaltenden Dialyseschlauch (Sigma D9652) eingebracht. Unter Kühlung wurde die DNS 2 Stunden bei 145mA in 1xTBE in einer horizontalen Elektrophoresekammer eluiert und im Anschluss durch Ethanolfällung (3.2.2.) aus dem Puffer isoliert.

### **3.2.2.4 GFX-Säulen**

Das GFX-Kit (Amersham Biosciences) wurde zur schnellen Aufreinigung von DNS oder zur Extraktion von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen verwendet. Die Durchführung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers.

## **3.2.3 Enzymatische Modifikation von DNS**

### **3.2.3.1 Restriktionsverdau**

Enzymmenge, Pufferbedingungen und Temperatur richteten sich nach Angaben des Herstellers (New England Biolabs).

### **3.2.3.2 Phosphorylierung von DNS-Linkern**

Zur Konstruktion eines Linkers aus zwei komplementären Primern müssen die 5'-OH-Enden phosphoryliert werden, da Ligasen einen 5'-Phosphatrest benötigen. Verwendet wurde hierfür die T4-Polynukleotidkinase (NEB), die diese Reaktion unter ATP-Verbrauch katalysiert. Die beiden komplementären Primer wurden zusammenpipettiert (je 20 pmol), auf 90 °C erhitzt und langsam über 30 Minuten abgekühlt. Der Ansatz wurde mit 20 Units T4-Polynukleotidkinase und ATP-haltigen Puffer für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Das Enzym wurde anschließend bei 75 °C für 10 Minuten inaktiviert.

### **3.2.3.3 Dephosphorylierung von DNS-Fragmenten**

Um ungewollte Ringschlüsse durch Religation der linearisierten Vektor-DNS zu verhindern, wurden die terminalen Phosphatgruppen durch eine Alkalische Phosphatase (CIP = calf intestine phosphatase, NEB) entfernt. Nach der Restriktion eines Vektors wurde mit 10 U CIP für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Phosphatase ist in allen Restriktionspuffern von NEB aktiv und konnte so ohne vorherige Reinigung der DNS nach der Restriktion eingesetzt werden.

### **3.2.3.4 Ligation von DNS-Fragmenten**

Linearisierte DNS-Fragmente (Vektor und zu integrierende DNS) können miteinander verknüpft werden. Diese Reaktion wird durch die T4-DNA-Ligase (NEB) unter ATP-Verbrauch zwischen einer endständigen 5'-Phosphat- und einer 3'-OH-Gruppe katalysiert. Die auf diese Weise entstehenden zyklischen Plasmide enthalten die fremde DNS in der Sequenz des Vektors.

Für die Ligation wurde in 15 µl Gesamtvolumen der linearisierte Vektor mit einem zwei- bis vielfachen Überschuss an zu integrierender Fremd-DNS, dem ATP-haltigen Ligasepuffer und 400 Units Ligase zusammenpipettiert und über Nacht bei 16 °C oder eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

## **3.2.4 Elektrophoretische Auftrennung und Isolierung von DNS aus Agarosegelen**

DNS-Proben wurden mit DNS-Proben-Auftragspuffer versetzt und in Agarosegelen im TBS-Puffersystem elektrophoretisch aufgetrennt. Dabei wurden zwischen 0,7 %ige (2000bp-genomische DNA) und 2 %ige (300 – 1000bp) Agarosegele verwendet. Die Auswertung und Dokumentation erfolgte unter UV-Licht am Geldoc 2000 (Biorad). Zur Isolierung wurden die

entsprechenden DNS-Banden aus dem Gel ausgeschnitten und unter Verwendung des GFX-Kits (Amersham Biosciences) nach den Angaben des Herstellers eluiert.

## Lösungen

### 10x TBE

Tris HCL	0,9 M
Borsäure	0,9 M
EDTA pH 8,0	20 mM

### Auftragepuffer (6xdye)

10x TBE	60 %
Ficoll Type 400	18 %
EDTA pH 8,0	0,12 mM
Bromphenolblau	0,15 %
Xylencyanol FF	0,15 %

### 3.2.4.1 Agarosegele

Standardmäßig wurden zur Auftrennung von DNS-Fragmenten Agarosegele verwendet. Die entsprechende Menge Agarosepulver wurde in 1x TBE in der Mikrowelle unter Aufkochen geschmolzen, im Wasserbad auf 50 °C abgekühlt, und mit 800 ng/ml Ethidiumbromid (Stammlösung 10 mg/ml, Roth) versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 bis 150 V, je nach Größe des Gels 30 Minuten bis mehrere Stunden. Der Fortschritt ließ sich anhand der beiden blauen Farbstoffe im Auftragepuffer verfolgen.

### 3.2.4.2 PAGE-Gele

5 % PAGE-Gele eignen sich zur Auftrennung kleiner DNS-Fragmente im Bereich zwischen 20 und 1000 bp. Unterschiede von Fragmentgrößen um wenige Basenpaare sind zu erkennen. PAGE-Gele wurden in einer Stärke von 0,75 mm (analytisch) bzw. 1,5 mm (präparativ) verwendet. Als Laufpuffer wurde 1x TBE verwendet.

### 5 % PAGE-Gel

Rotiphorese Gel	3,75 ml
(Acrylamid/N,N'-Bisacrylamid = 29:1, 40 %ige wässrige Lösung)	
10 x TBE	3 ml
H <sub>2</sub> O	ad 30 ml
TEMED (N,N,N',N' - Tetramethylethylendiamin)	20 µl
20 % APS (Ammoniumperoxodisulfat)	70 µl

Die Laufbedingungen waren 100 V für 10 Minuten, anschließend 260 V für 50 Minuten. Die Färbung des Gels erfolgte durch 0,6 µg/ml Ethidiumbromid für 10 Minuten. Anschließend

wurde zur Entfernung des überschüssigen Ethidiumbromids 5 Minuten mit Wasser gewaschen.

### 3.2.5 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde im Rahmen dieser Arbeit zu verschiedensten Zwecken eingesetzt und die Bedingungen jeweils speziell an die Erfordernisse angepasst. Durchgeführt wurden die Reaktionen mit einem Thermocycler T1 (Biometra).

### Lösungen

#### 10x PCR-Puffer (Promega)

KCl	500 mM
Tris HCl (pH9,0)	100 mM
MgCl <sub>2</sub>	15 mM
Triton ® X-100	1 %

#### dNTP-Stammlösung 1,25 mM

dGTP (100 mM)	10 µl
dATP (100 mM)	10 µl
dTTP (100 mM)	10 µl
dCTP (100 mM)	10 µl
H <sub>2</sub> O	ad 800 µl

#### 10x cloned Pfu-Puffer

Tris HCl pH8,8	200 mM
MgSO <sub>4</sub>	20 mM
KCl	100 mM
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	100 mM
Triton ® X-100	1 %
BSA	1 mg/ml

### Allgemeines Protokoll

Sämtliche PCR-Reaktionen wurden nach dem folgenden Protokoll durchgeführt:

#### Reaktionsansatz für die PCR

DNS (je nach Konzentration)	0,5-4,0 µl
Primer 1 (10 pmol/µl)	2,5 µl
Primer 2 (10 pmol/µl)	2,5 µl
dNTP-Stammlösung (1,25mM)	8,0 µl
10x PCR Puffer	5,0 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl
H <sub>2</sub> O	ad 50,0 µl



Tabelle 3-1 Reaktionsbedingungen für die PCR

(1) initiale Denaturierung	94 °C	5 min	
(2) Denaturierung	94 °C	30 s	20 - 45 Zyklen
(3) Primeranlagerung	50-68 °C	30 s	
(4) Elongation	72 °C	15-90 s	
(5) finale Polymeraseaktivität	72 °C	5 min	

Folgende Bedingungen wurden angepasst: (3) die Temperatur zur Primeranlagerung wurde an die jeweilige Schmelztemperatur angepasst, (4) die Elongationszeit wurde entsprechend des zu erwartenden Amplifikationsproduktes angepasst, 1000 Basenpaare pro Minute für die Taq-Polymerase und 500 Basenpaare pro Minute für die Pfu-Polymerase. Die Zahl der Zyklen richtete sich nach der Konzentration der Ausgangs-DNS und nach dem Verwendungszweck (analytisch oder präparativ).

### 3.2.5.1 Fehlerkorrigierende PCR

Für präparative Zwecke, wie der Klonierung von Fragmenten, in die eine Mutation eingefügt wurde, wurde eine rekombinante Pfu-Polymerase (Stratagene) verwendet. Im Gegensatz zur Taq-Polymerase hat die Pfu-Polymerase Exonukleaseaktivität und kann somit Synthesefehler erkennen und korrigieren.

### 3.2.5.2 Genotypisierung

Zur Bestimmung des Genotyps der im Rahmen dieser Arbeit erzeugten und verwendeten Mauslinie (KI), wurde ein spezifisches PCR-Protokoll mit anschließendem Restriktionsverdau entwickelt und angepasst, um diese Routinearbeit möglichst zu vereinfachen.

Tabelle 3-2 Genotypisierungsprimer

<b>Forward- Primer</b>	<b>Reverse- Primer</b>	<b>PCR- Fragment</b>
EC30f	EC26r	2690bp

Tabelle 3-3 Reaktionsbedingungen für die Genotypisierungs-PCR

(1) initiale Denaturierung	94 °C	5 min	29 Zyklen
(2) Denaturierung	94 °C	1 min	
(3) Primeranlagerung	58 °C	30 s	
(4) Elongation	72 °C	3 min	
(5) finale Polymerisation	72 °C	5 min	

Das hierbei entstehende PCR-Produkt wurde im Anschluss über eine GFX-Säule aufgereinigt und mit der Restriktions-Endonuklease NgoMIV (NEB) verdaut.

#### **Verdau**

DNS (aus PCR)	5 µl
PCR-Puffer 4	2 µl
10x BSA (1 µg/µl)	2 µl
NgoMIV (10U/µl)	1 µl
H <sub>2</sub> O	ad 20 µl

Fragmentlänge der PCR-Produkte nach der Inkubation mit NgoMIV

Genotyp	Fragmentlänge
Heterozygot HCN2-KI	2690 bp
WT	2690 bp 2140 bp 550 bp

### **3.2.5.3 Sequenzierung**

DNS-Sequenzierung wurde mit dem ABI Prism 310 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems) durchgeführt. Das Prinzip beruht auf der Didesoxymethode (Sanger, Nicklen et al. 1977), bei der markierte Didesoxynukleotide mit Desoxynukleotiden während der PCR um die Integration in die zu amplifizierende DNS-Fragmente konkurrieren und einen Kettenabbruch erzeugen. Bei günstigem Verhältnis von ddNTPs zu dNTPs entsteht ein Gemisch von DNS-Fragmenten, in dem alle möglichen Fragmentlängen vorhanden sind. Im verwendeten Reaktionsmix (ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready

Reaction Kit; PE Applied Biosystems) sind alle vier ddNTPs an vier verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt. Nach kapillarelektrophoretischer Auftrennung der unterschiedlich langen Fluoreszenz-markierten Fragmente werden diese mittels Laser detektiert. Die Auswertung erfolgt über eine Software.

Dabei ermöglicht eine Sequenzierungsreaktion die Identifikation von bis zu 400 Basenpaaren. Für längere Sequenzen müssen mehrere überlappende Reaktionen angesetzt werden.

#### Reaktionsansatz für die Sequenzierung

DNS (200 ng)	0,5-4,0 µl
Primer (10 pmol/µl)	1,0 µl
Ready Reaction Mix	2,5 µl
H <sub>2</sub> O	ad 12,0 µl

Tabelle 3-4 Reaktionsbedingungen für die Sequenzierreaktion

(1) initiale Denaturierung		94 °C	2 min	
(2) Denaturierung		94 °C	30 s	45 Zyklen
(3) Primeranlagerung		50 °C	40 s	
(4) Elongation		60 °C	4 min	

Zur Abtrennung nicht integrierter Didesoxynukleotide wurden die erhaltenen Reaktionsprodukte mit Ethanol/Natriumacetat (250 µl 100 % Ethanol, 88 µl H<sub>2</sub>O, 10 µl Natriumacetat pH 5,2) gefällt. Anschließend wurde 20 Minuten bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert, mit 250 µl 70 % Ethanol gewaschen, nochmals 5 Minuten bei 13000 rpm pelletiert und in der Vakuumzentrifuge für 10 Minuten getrocknet. Nach dem Lösen des DNS-Pellets in 30 µl Wasser wurde sofort sequenziert oder die Probe bei -20°C gelagert.

### 3.2.6 Southern Blot

Das Southern Blot Verfahren dient der Identifizierung eines bestimmten DNS-Fragments aus einer Gesamt-DNS. Mittels Gelelektrophorese aufgetrennte DNS-Moleküle werden auf eine Membran übertragen, dort durch UV-Bestrahlung immobilisiert und mit radioaktiv markierten, spezifischen DNS-Sonden detektiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Southern Blots zur Analyse der ES Zellklone verwendet.

**Lösungen:****3 M NaCl:**

NaCl	175,32 g
H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

**1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:**

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	69,0 g
H <sub>2</sub> O	ad 500 ml

**1 M Tris:**

Tris	121,14 g
H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

pH 8 einstellen

**20 x SSC:**

NaCl	350,6 g
Na <sub>3</sub> -Citrat x 2 H <sub>2</sub> O	176,4 g
H <sub>2</sub> O	ad 2000 ml

**0,5 M Tris/ 3 M NaCl :**

Tris 1 M	500 ml
H <sub>2</sub> O	300 ml
NaCl	175,32 g
H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

**20 % SDS :**

SDS	200 g
H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

**1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>:**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	355,98 g
H <sub>2</sub> O	ad 2000 ml

**1 M NaOH:**

NaOH	20 g
H <sub>2</sub> O	ad 500 ml

**0,2 M HCL:**

HCl <sub>konz</sub>	10 ml
H <sub>2</sub> O	ad 500 ml

**0,5 M EDTA:**

EDTA	93,06 g
H <sub>2</sub> O	ad 500 ml

pH 8 einstellen

**TE-Puffer:**

Tris 1 M pH 8	10 ml
EDTA 0,5 M pH 8	2 ml
H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

**ssDNA 10 mg/ml:**

Salmon sperm DNA 500 mg (Invitrogen)	
H <sub>2</sub> O	ad 50 ml

**Church-Puffer:**

BSA	5 g
H <sub>2</sub> O	50 ml
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1 M	193,5 ml
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1 M	56,5 ml
20 % SDS	175 ml
EDTA 0,5 M pH 8	1 ml
ssDNA (vor Gebrauch 5 min/100°C denaturieren)	5 ml
H <sub>2</sub> O	ad 500 ml

**3.2.6.1 Gelelektrophorese:**

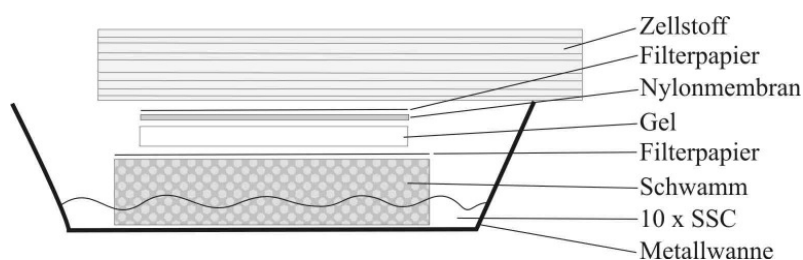
Plasmid-DNS, Stammzell-DNS oder genomische DNS aus Mausgewebe wurde über Nacht einer enzymatischen Restriktion unterzogen (3.2.3.1).

Die verdaute DNS wurde auf Agarosegelen (0,5 – 1%) aufgetrennt (3.2.4.1). Das fertige Gel wurde 10 min in 0,2 M HCl geschwenkt. Dies führt zu partieller Depurinierung und dadurch zu Strangbrüchen. Nach 30-minütiger Denaturierung in 0,5 M NaOH / 1,5 M NaCl wurde 30 min in 0,5 M TRIS pH8 / 3 M NaCl neutralisiert.

**3.2.6.2 Blottingverfahren:**

Die DNS wurde über Nacht auf eine Nylonmembran (Genescreen Plus<sup>®</sup>, Perkin Elmer, Kat.Nr. NEF988) transferiert.

Dazu wird die Membran auf das Gel aufgelegt. Durch einen mit 10x SSC getränkten Schwamm unter dem Gel und einem Stapel Saugpapier auf dem Gel werden Kapillarkräfte erzeugt, die die DNS auf die Membran übertragen. Der detaillierte Aufbau ist in Abbildung 1-1 gezeigt.



**Abbildung 1-1 Southern Blot Analyse: Aufbau zum Transfer der DNS auf die Nylonmembran**

Am folgenden Tag wurde die Membran 1 min in 0,4 M NaOH und 1 min in 0.2 M TRIS/HCl pH7.5 / 1x SSC neutralisiert. Im Anschluss wurde die Membran zur kovalenten Bindung der DNS in einem CI-1000 Ultraviolet Crosslinker (UVP) mit UV-Licht bestrahlt (120 mJ/cm<sup>2</sup>) und 2 Stunden bei 80°C in einem Heraeus Vacutherm Ofen (VT 6025) gebacken.

### 3.2.6.3 Herstellung einer <sup>32</sup>P-markierten Gensonde:

Die Matrizen für die Sonden wurden mittels PCR oder mittels Restriktion von Plasmid-DNS gewonnen. Eine tabellarische Übersicht der verwendeten Sonden ist im Anhang in Tabelle 7-1 zu finden.

Die Herstellung erfolgte mit dem Random primed Labeling Kit (Roche, Kat.Nr. 1004760). Dabei wird ein Gemisch aus Hexanukleotiden als Primer verwendet. Von diesem ausgehend wird der komplementäre Strang unter Einbau von  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP durch das Klenow-Enzym synthetisiert.  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP wurde von Amersham bezogen.

#### Reaktionsansatz:

DNS	ca. 100 ng
H <sub>2</sub> O	ad 7 $\mu$ l

=> 10 min Denaturierung bei 97°C

dXTP-Mix (dATP, dGTP, dTTP, je 0,5mM)	3 $\mu$ l
Reaction-Mix	2 $\mu$ l
$\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP	7 $\mu$ l
Klenow-Enzym	1 $\mu$ l

Der Ansatz wurde 30 min bei 37 °C inkubiert, über eine Nick<sup>TM</sup> Column (Pharmacia) aufgereinigt (Größenausschluss-Chromatographie) und die spezifische Aktivität der eluierten Sonde mit Hilfe eines Szintillationszählers (Beckman LS 6500) bestimmt.

### 3.2.6.4 Hybridisierung:

Die Membran wurde 2 bis 4 Stunden in 15 ml Church-Puffer bei 60 °C prähybridisiert, um freie Bindungsstellen zu maskieren. Die Hybridisierung mit der <sup>32</sup>P-markierten Sonde erfolgte in 10 ml Church-Puffer in einem Rollhybridisierer (Biometra Compact Line OV4) bei 60 °C

über Nacht. Überschüssige und unspezifisch gebundenen Sonde wurde durch folgende Waschschrirte von der Membran gewaschen:

15 Minuten    2x SSC / 0,1 % SDS    62 °C

30 Minuten    0,4x SSC / 0,1 % SDS    68 °C

30 Minuten    0,4x SSC / 0,1 % SDS    70 °C

Die Visualisierung der Banden erfolgte zunächst durch Auflegen einer Phospho-Imager-Platte über Nacht (Fujifilm Imaging Plate BAS-MP 2040S, Auswertung mit einem Fujifilm BAS-1500) sowie durch Auflegen eines Films für sieben Tage (Amersham Hyperfilm<sup>TM</sup> MP, Entwicklung mit Entwickler und Fixierer von Adefo (T-Matic, 00034 bzw. 00091) an einer Agfa Curix 60 Entwicklerrnaschine).

### **3.2.6.5 Rehybridisierung der Blots**

Um einen Blot mit einer zweiten Sonde hybridisieren zu können, wurde in 2 bis 3 Waschschrirten à 15 min bei 97 °C in 0,4x SSC / 0,1 % SDS die Sonde von der Membran gewaschen. Zur Kontrolle wurde über Nacht eine Phospho-Imager-Platte aufgelegt und bei Bedarf am nächsten Tag nochmals gewaschen.

War auf der Membran keine Radioaktivität mehr detektierbar, wurde sie wieder prähybridisiert und mit einer radioaktiv markierten Sonde rehybridisiert.

### 3.3 Protokolle zur Arbeit mit Protein

#### 3.3.1 Membranpräparation von Proteinen aus Maus-Geweben und HEK293-Zellen

Zur Weiterverwendung in Western Blot Analysen wurden Membranproteine aus Mausgewebe (Herz, Gehirn) oder transfizierten HEK293-Zellen isoliert.

Dabei wurde die durch Homogenisation in einem „Potter“ entstandene Mikrosomenfraktion, die die Membranproteine enthielt, durch Zentrifugation von den restlichen Zellbestandteilen getrennt.

Proteine werden nach der Lyse der Zelle sehr schnell durch Proteasen gespalten und daher wurden alle Arbeitsschritte zügig bei 4 °C durchgeführt, sowie dem Lysepuffer ein Gemisch aus Proteaseinhibitoren zugesetzt.

Das Zellpellet bzw. das Gewebe wurde mit 2 ml Lysepuffer versetzt und mit circa 10 Hüben auf Eis mit einem Potter (Potter S, B.Braun Biotech International) homogenisiert. Nach 10 min Zentrifugation bei 5000 g (8.700rpm) / 4 °C wurde der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde noch zweimal auf die gleiche Weise behandelt. Die Überstände wurden einer Ultrazentrifugation unterzogen (45 min / 30000rpm, Beckman Coulter Optima<sup>TM</sup> LE-80K) und die Pellets in 100 µl Lysepuffer resuspendiert.

#### Triton X- Lysepuffer mit Proteaseinhibitoren

Leupeptin (Calbiochem)	1 µg/ml
Pepstatin A (Sigma)	1 µM
Antipain (Calbiochem)	1 µg/ml
PMSF (Fluka)	100 µM
1,10-Phenanthrolin (Fluka)	1 mM
Benzamidin (Sigma)	1 mM
Iodacetamid (Sigma)	1 mM

#### 3.3.2 Protein Isolation aus Gewebe

Das Gewebe wurde in Ethanol/Trockeneis schockgefroren und in einer auf Trockeneis vorgekühlten Reibschale zermahlen. Das erhaltene Gewebe-Homogenisat wurde in 2 ml Eppendorfgläsern mit 2 % SDS/50 mM TRIS für 5 Minuten bei 95 °C inkubiert, kurz



gevoertext und nochmals 5 Minuten bei 95°C inkubiert. Das Puffervolumen war vom zu lysierenden Gewebe abhängig:

Hirn	1 ml
Herz	200 µl

Die Lysate wurden bei -80°C gelagert.

### 3.3.3 Quantifizierung von Proteinen

Der Proteingehalt wurde mittels der Bradford-Methode bestimmt. Hierzu wurde eine Standardreihe von 1 – 30 µg Protein (BSA, bovines Serum Albumin) in je 100 µl 0,15 M NaCl nach Zugabe von je 1 ml Coomassie Lösung erstellt. Nach einer Minute bei RT wurde die Absorption bei 595 nm vermessen (Eppendorf Bio Photometer). Die Proteinproben wurden analog vermessen und vom Photometer anhand der Standardreihe quantifiziert.

<u>Coomassie Lösung</u>	
Coomassie brilliant blue G250	50 mg
EtOH 95%	25 ml
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	50 ml
H <sub>2</sub> O	ad 500 ml

### 3.3.4 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE

SDS-Polyacrylamidgele ermöglichen die Auftrennung von Proteingemischen nach ihrer Größe. Durch einen Denaturierungsschritt bei 97°C für 5 Minuten und der Zugabe von SDS wird die räumliche Struktur zerstört. Die Proteine werden dabei von den negativ geladenen SDS-Molekülen umgeben. Auf diese Weise spielen für die Auftrennung proteineigene Ladungen keine Rolle mehr (Laemmli 1970).

#### Lösungen

##### 4 x Trenngelpuffer

Tris	1,5 M
SDS	0,4 %
pH 8,8	

##### 4 x Sammelgelpuffer

Tris	0,5 M
SDS	0,4 %
pH 6,8	

**10 x TBS**

Tris	12,1 g
NaCl	80,23 g
pH 8,0	

**10x Elektrophoresepuffer**

Tris	30,2 g
Glycin	144 g
SDS	10 g
H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

**6 x Probenpuffer (Lämmli)**

Tris-Cl/SDS pH 6,8	7 ml
Glycerol	3 ml
SDS	1 g
Bromphenolblau	1,2 mg
H <sub>2</sub> O	ad 10 ml

**Blockierungslösung**

Milchpulver	5 %
in 1 x TBST	

**10 % Trenngel**

PAGE-Stammlösung	5 ml
4 x Trenngelpuffer	3,75 ml
H <sub>2</sub> O	6,25 ml
20 % APS	30 µl
TEMED	10 µl

**7 % Trenngel**

PAGE-Stammlösung	3,5 ml
4xTrenngelpuffer	3,75 ml
H <sub>2</sub> O	7,75 ml
20 % APS	30 µl
TEMED	10 µl

**Transferpuffer**

10 x Elektrophorese-	
Puffer	80 ml
Methanol	300 ml
H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

**Coomassie-Lösung**

Coomassie brilliant	
blue R-250	0,006 %
Eisessig	10 %
H <sub>2</sub> O	90 %

**PAGE-Stammlösung**

(Rotiphorese Gel 30)	
Acrylamid	30 %
Bisacrylamid	0,8 %

**TBST**

Tween 20	0,1 %
in 1 x TBS	

<u>Fixierlösung</u>		<u>Sammelgel</u>	
Isopropanol	25 %	PAGE-Stammlösung	0,65 ml
Eisessig	10 %	4 x Sammelgelpuffer	1,25 ml
H <sub>2</sub> O	65 %	H <sub>2</sub> O	3,05 ml
		20 % APS	25 µl
		TEMED	5 µl

### Durchführung

Das Gießen der Gele und die anschließende Elektrophorese wurde in einer Mini-Gel Apparatur (Protean 3, Biorad) durchgeführt. Daraufhin wurden die aufgetrennten Proteine im Gel unspezifisch mit Coomassie angefärbt oder durch Western Blot (3.3.4.2) auf eine Membran übertragen und danach spezifisch nachgewiesen.

Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proteinproben mit 6 x Lämmli-Puffer versetzt, für 5 Minuten bei 95 °C im Wasserbad denaturiert, und in die Taschen pipettiert. Als Größenstandard wurde die Kaleidoscope Protein Ladder (Biorad) mit aufgetragen. Die Elektrophorese in 1 x Elektrophoresepuffer dauerte bei 100 V etwa zwei Stunden.

#### 3.3.4.1 Färben der Proteine im Gel

Das Gel wurde für eine Stunde in Coomassie-Gelfärbungs-Lösung geschwenkt. Nach Entfärben des Gels in 10 % Essigsäure bis zum Sichtbarwerden der Proteinbanden kann das Gel zur Dokumentation zwischen zwei Folien gescannt werden.

#### 3.3.4.2 Western Blot

Der Transfer wurde mit einem Tank-Blot System (Mini Trans Blot, Biorad) durchgeführt. Es wurde eine PVDF-Membran (Immobilon, Millipore) verwendet, die zuvor zwei Minuten in Methanol eingeweicht und dann für 15 Minuten in Transferpuffer äquilibriert wurde. Der Transfer wurde in vorgekühltem Transferpuffer mit einem zusätzlichen Kühlelement für etwa eine Stunde bei 100 V und maximal 300 mA durchgeführt.

Die Membran wurde danach kurz in Methanol geschwenkt und für eine Stunde bei 37°C getrocknet. Danach wurde die Membran für eine Stunde in Blockierungslösung bei

Raumtemperatur geschüttelt. Nach dreimaligem Waschen in 1 x TBST wurde sie mit dem primären Antikörper in TBST und 1 % Milchpulver für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten in 1 x TBST folgte die Inkubation mit dem entsprechenden sekundären, peroxidasegekoppelten Antikörper für eine Stunde. Nach drei Waschschritten in 1 x TBST konnte das nachzuweisende Protein durch den spezifischen Antikörper mit Hilfe des ECL-Kits (Amersham) durch Chemolumineszenz detektiert werden. Dies geschah durch Auflegen eines Films (Hyperfilm ECL, Amersham).

Die verwendeten Antikörper und deren Konzentrationen sind im Anhang (7.2) beschrieben.

### **3.3.5 Koimmunpräzipitation**

Gesamt-Gehirn- oder HEK293-Zell-Lysate (1 mg) wurden über Nacht bei 4°C mit 25 µl Protein-A-Sepharose (Sigma), zusammen mit einem spezifischen Antikörper, der gegen eines der beiden zu untersuchenden Proteine gerichtet war, und 500 µl AM0-Puffer am Rollhybridisierer (GFL Typ3025) inkubiert. Versetzt wurde der Ansatz mit Proteaseinhibitoren und 200 µM Natrium-Pervanadat, um Phosphatasen zu hemmen. Die Sepharose wurde durch Zentrifugation (15 Minuten, 4°C, 12000 x g) sedimentiert und dreimal mit kaltem AM200-Puffer (mit je 200 µM Natrium-Pervanadat) gewaschen. Interagierende Proteine wurden, nachdem der Ansatz 5 Minuten in Lämmli-Probenpuffer denaturiert wurde, durch SDS-PAGE und Western Blot (1.3.4.2) visualisiert.

Die verwendeten Antikörper und deren Konzentrationen sind im Anhang (7.2) beschrieben.

### **3.3.6 Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen**

Die GST-Fusionsproteine (pET41a-Vektor, Novagen) wurden im Protease-defizienten BL21 (DE3) Stamm von Escherichia Coli durch Induktion mit 0,1 mM Isopropyl-β-Thiogalaktopyranosid (IPTG) für etwa eine Stunde bei 37 °C exprimiert. Danach wurden die Bakterien durch Zentrifugation (10 min, 4 °C, 5000 x g) pelletiert und in 4 ml PBS, dem Protease-Inhibitoren (1 µg/ml Leupeptin, 1 µM Pepstatin A, 1 µg/ml Antipain, 0,1 mM PMSF, 1 mM Orthophenantrolin, 1 mM Benzamidin, 1 mM Iodacetamid) zugesetzt wurden, resuspendiert. Nach einmaligem Einfrieren und Auftauen wurde Lysozym (5 mg/ml) zugegeben und der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Triton X-100 wurde zupipettiert und 30 min geschüttelt, um die Löslichkeit der Fusionsproteine zu gewährleisten. Der Zell-Debris wurde abzentrifugiert (30 min, 10000 x g, 4 °C). Der Überstand wurde abgenommen, aliquotiert und bei -80 °C eingefroren. Zur Aufreinigung der Fusionsproteine wurden diese

mit Gluthation-Sepharose-Beads (Amersham Biosciences) bei 4 °C über Nacht inkubiert, dann zentrifugiert (5 min, 500 x g, 4 °C) und schließlich zweimal mit eiskaltem PBS (mit Protease-Inhibitoren) gewaschen. Die Beads wurden in einem Volumen PBS/ Protease-Inhibitoren gelöst und bei 4 °C bis zur Verwendung gelagert.

### **3.3.6.1 GST-Pull-Down-Versuche**

Hierfür wurden etwa 3 µg aufgereinigtes GST-Fusionsprotein in 1 ml Zell-Lysis-Puffer (50 mM Hepes (pH 7,5), 150 mM NaCl, 10 % Glycerol, 5 mM EDTA (pH 8,0), 0,1 % Triton X-100) gelöst. 10 µl Gluthation-Sepharose-Beads wurden zugegeben, dann wurde der Ansatz bei 4 °C drei Stunden inkubiert. Danach wurden die Sepharose-Beads bei 10000 x g 2 Minuten sedimentiert und dreimal mit eiskaltem AM0-Puffer gewaschen. Nachdem der Überstand verworfen war, wurden die so behandelten Beads mit transfizierten oder nicht-transfizierten totalen HEK293-Zelllysaten für vier Stunden bei 4°C inkubiert. Daraufhin wurden die Beads zentrifugiert (10000 x g, 4°C, 2 min) und in AM200 gewaschen. Dieser Schritt wurde weitere zweimal wiederholt, bevor die Beads pelletiert und mit 20 µl Lämmli-Proben-Puffer versetzt wurden. Der Ansatz konnte nun 5 Minuten bei 100°C denaturiert und auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen werden.

### **3.4 Kultur eukaryontischer Zellen**

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Laminar Air Flow durchgeführt (Heraeus, Hera safe HS18). Die verwendeten Medien und Lösungen wurden vor ihrer Verwendung auf 37 °C erwärmt.

#### **3.4.1 Basismedium**

Als Medium wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Nr. 21885-025, Gipro) verwendet. Zugewetzt wurden diesem 10 % fötales Rinderserum (FBS, Nr. S0115, Biochrom) und Antibiotika (Penicillin G 100 U/ml und Streptomycin 100 µg/ml).

#### **3.4.2 Kultur von HEK293-Zellen**

Zur Expression von HCN-Kanälen wurde die Zelllinie HEK293 (human embryonic kidney cells, ATCC® Nr.CRL 1573) verwendet. Diese humane embryonale Nierenzelllinie wurde durch Transfektion mit dem humanen Adenovirus Typ 5 immortalisiert.

#### **3.4.3 Kulturbedingungen**

Die Kultur der HEK293-Zellen erfolgte bei 37 °C / 10 % CO<sub>2</sub> in DMEM-Medium der Firma Gibco (mit GlutaMAX™, 1000 mg/l D-Glucose, Natriumpyruvat), dem 10 % FBS (Biochrom) sowie Penicillin/Streptomycin (finale Konzentration 100 U Penicillin G, 100 µg/ml Streptomycin) zugewetzt wurde.

#### **3.4.4 Transfektion von HEK-Zellen**

Die Transfektion von Plasmiden erfolgte über Lipofektion (FuGENE 6, Roche). Liposomen bilden mit Plasmid-DNS in serumfreien Lösungen Komplexe, die mit der Zellmembran verschmelzen und durch Endozytose ins Zellinnere gelangen (Felgner et al., 1987).

### 3.5 Kultur und genetische Modifikation (gene-targeting) von murinen embryonalen Stammzellen

Stammzellen wurden während der gesamten Prozedur auf sogenannten Feederzellen (embryonale Fibroblasten) kultiviert. Dies gewährleistet den Erhalt der Pluripotenz der ES-Zellen. Feederzellen geben bisher weitgehend noch unbekannte Stoffe ins Medium ab, die die Stammzellen am Differenzieren hindern. Zusätzlich wurde dem Medium noch LIF (Leukämie inhibierender Faktor) zugesetzt.

Die verwendeten Protokolle entstammen dem Buch „Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual“, Hogen et al., 2. Ausgabe 1994, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

#### 3.5.1 Herkunft der Stammzellen

Als ES-Zellen wurden Stammzellen der Zelllinie R1 (Nagy, Rossant et al. 1993) verwendet. Zu Beginn befanden sich diese in der 15. Passage.

#### 3.5.2 Kulturbedingungen

Alle verwendeten Kulturgefäße (Petrischalen und Flaschen) wurden von der Firma Sarstedt bezogen.

Tabelle 3-5 Volumina für die ES-Zellkultur

	Medium/PBS	Trypsin/EDTA
175 cm <sup>2</sup> Flasche	20 ml	4 ml
75 cm <sup>2</sup> Flasche	12 ml	3 ml
25 cm <sup>2</sup> Flasche	5 ml	1 ml
10 cm Petrischale	10 ml	2 ml
96 well-Plate	200 µl/well	30 µl/well
24 well-Platte	1,5 ml/well	300 µl/well
6 well-Platte	4 ml/well	700 µl/well

Die Kultur der ES-Zellen erfolgte bei 37°C / 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank. Als Nährmedium wurde Gibco DMEM High Glucose (Invitrogen, Kat.Nr. 31966-021, mit GlutaMAX<sup>TM</sup>I, 4500mg/l D-Glucose, Natriumpyruvat) verwendet, dem FBS, LIF, β-Mercaptoethanol und G418 bzw. Ganciclovir zur Selektion zugesetzt wurden.

**ES-Medium**

	DMEM	399 ml
	FBS	100 ml
	LIF (0,5 x 10 <sup>6</sup> U/ml)	1 ml
	β-Mercaptoethanol (Sigma)	3,5 µl
Zur Selektion:	G418-Lösung (100 mg/ml)	2 ml
	oder:	
	Ganciclovir-Lösung (10 mM)	100 µl

**FBS (Fötales Rinderserum):**

Für ES-Zellkultur getestetes FBS wurde von Biochrom bezogen (Kat.Nr. S0115, Charge Nr. 437A). Jede Flasche wurde 30 min bei 56°C Hitze-inaktiviert und in Aliquots bei -20°C gelagert.

**LIF (Leukämie-inhibierender Faktor):**

Durch LIF-Zusatz wird eine Ausdifferenzierung der pluripotenten Stammzellen verhindert (Williams et al., 1988). In der vorliegenden Arbeit wurde ESGRO<sup>TM</sup>, ein muriner rekombinanter Leukämie-inhibierender Faktor verwendet (Kat.Nr. ESG1106, Lot Nr. 11051051, Chemicon). Die Stock-Lösung (10<sup>7</sup> U/ml) wurde in 20 ml EF-Medium verdünnt und in 1 ml Aliquots bei 4 °C gelagert. Die finale Konzentration im Medium betrug 1000 U/ml.

**G418-Lösung 100 mg/ml:**

Mit Hilfe von Geneticinsulfat (G418, Kat.Nr. 11811-064, Invitrogen), einer Neomycin-analogen Substanz, wurde eine positive Selektion auf Klone, die den Targetingvektor erfolgreich integriert hatten, durchgeführt. Es wurden Stocks mit 100 mg/ml in PBS hergestellt und bei -20 °C gelagert. Die finale Konzentration im Medium betrug 0,4 mg/ml. Die Zugabe erfolgte 24 Stunden nach der Elektroporation mit dem Targeting-Vektor.

**Ganciclovir-Lösung:**

Im sekundärem Targeting erfolgte die Selektion auf die erfolgreiche Deletion des Thymidinkinasegens des Targetingkonstrukts mit Ganciclovir. In Zellen, die die Thymidinkinase noch exprimieren, wird Ganciclovir durch Phosphorylierung aktiviert und die Zellen sterben ab.



---

Zur Herstellung der Stocks wurde eine Ampulle Ganciclovir-Natrium (Cymeven<sup>®</sup>, Roche, PZN 3851388, 500 mg Ganciclovir) in 10 ml H<sub>2</sub>O gelöst, diese Lösung nochmals 1:20 verdünnt und in Aliquots bei –20 °C gelagert. Im Medium wurde eine finale Konzentration von 2 µM eingesetzt. Die Zugabe erfolgte 48 Stunden nach der Elektroporation mit dem Cre-Plasmid.

#### **Trypsin/EDTA:**

Um die ES-Zellen zum Ernten und Passagieren von den Kulturgefäßen zu lösen, wurden sie 9 min bei 37 °C mit 1x Trypsin/EDTA inkubiert. Die Stocklösung (10x Trypsin/EDTA von Invitrogen, Kat.Nr. 35400-027) wurde mit PBS auf 1x Trypsin/EDTA bzw. 2x Trypsin/EDTA verdünnt, in Aliquots bei –20 °C weggefroren und nach dem Auftauen bei 4 °C gelagert

Die Kultur der ES-Zellen erfolgte auf Feederzellen (3.6). Das Medium der ES-Zellen wurde jeden Tag zur gleichen Zeit (+/- 2 Stunden) gewechselt.

### 3.6 Feederzellen

Feederzellen müssen wie die ES-Zellen die Selektion in G418-haltigen Medium überstehen. Daher wurden Fibroblasten benötigt, die eine Neomycinresistenz aufweisen. Um dies zu ermöglichen, wurden CNGA3 KO-Männchen mit WT-Weibchen verpaart, wodurch alle Embryonen heterozygot für die Neomycinphospho-Transferase waren. Diese liegt im CNGA3-KO-Lokus (Biel, Seeliger et al. 1999).

#### 3.6.1 Gewinnung embryonaler Fibroblasten

Über Nacht wurde je ein CNGA3-Männchen mit zwei WT-Weibchen zusammengesetzt. Am folgenden Morgen wurden die Weibchen auf einen vaginalen Pfropf aus Samenflüssigkeit untersucht (plug check). War dieser Pfropf vorhanden, wurde das beim Weibchen als Schwangerschaftstag 0,5 (entsprechend dem Alter des Embryos) bestimmt. Am Tag 14,5 post coitum wurden die Embryos präpariert. Dazu wurde das schwangere Weibchen durch zervikale Dislokation getötet, in 70 % Ethanol gebadet und die Bauchdecke aufgeschnitten. Der Uterus wurde herausgelöst und in eine Petrischale mit 12 ml 1 x PBS überführt. Aus dem Korpus der Embryos wurden Herz, Leber und Lunge (alle dunkelrot gefärbten Organe) entnommen. Währenddessen wurde in ein 50 ml Röhrchen (Falcon) 1 ml 1 x Trypsin/EDTA pro Embryo vorgelegt. Die Embryonen wurden mit einer Schere zerkleinert und in dem vorgelegten Trypsin 10 min bei 37°C inkubiert. Die Suspension wurde mit immer kleineren Pipetten homogenisiert (25 ml Pipette, 10 ml Pipette und schließlich 5 ml Pipette). Pro Embryo wurden 1,5 ml EF-Medium zugegeben. Die Zellsuspension wurde erneut sehr intensiv (5-10 min) mit einer Pipette homogenisiert. Das Röhrchen wurde stehengelassen, um Zelltrümmer absinken zu lassen. Währenddessen wurden pro Embryo 2 Zellkulturflaschen (175 cm<sup>2</sup>) vorbereitet, in die je 19 ml EF-Medium vorgelegt wurden. Hierzu gab man je 1 ml des Überstandes der Zellsuspension.

#### 3.6.2 Kultivierung und Passagieren der Feederzellen

Inkubiert wurden die Feederzellen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>, bis nach ungefähr drei Tagen die Kulturflasche konfluent bewachsen war. Daraufhin wurden die Zellen noch zwei weitere Tage kultiviert und danach das Medium abgesaugt. Den Zellrasen wusch man in 20 ml 1 x PBS, gab 4 ml 1 x Trypsin/EDTA zu und inkubierte alles bei 37 °C für 5 min. Nach Zugabe von 6 ml EF-Medium wurde die Zellsuspension homogenisiert. 9 ml dieser Zellsuspension wurden in 50 ml-Röhrchen (Falcon) überführt. Die restlichen 1 ml in den Flaschen wurden mit je 19

ml EF-Medium aufgefüllt und wieder bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert, um die ganze Prozedur ein weiteres Mal durchführen zu können. Die Zellsuspension aus 5 Kulturflaschen wurde jeweils in einem 50 ml-Röhrchen vereinigt. Diese Röhrchen mit der Zellsuspension wurden 5 Minuten bei 100 rpm zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Jeweils 2 Pellets wurden in insgesamt 20 ml EF-Medium resuspendiert.

### **3.6.3 Bestrahlung von Feederzellen**

Da Feederzellen einen einschichtigen Rasen ausbilden sollten, wurden sie durch Bestrahlung mit energiereicher Strahlung (Röntgenstrahlung) teilungsunfähig gemacht. Durch diese Prozedur wird der Metabolismus der Zellen kaum beeinträchtigt. Die Bestrahlung erfolgte im Max-Planck Institut für Biochemie in Martinsried. Die Zellen waren während des Transports abgesunken, und das so gebildete Pellet wurde mit 5000 Rad (entsprach 4,41 min) bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurde das Pellet durch Schwenken wieder gelöst.

### **3.6.4 Herstellung von Gefrierstocks aus Feederzellen**

Die bestrahlte Zellsuspension wurde 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert und jedes Pellet in 15 ml EF-Medium resuspendiert. Nach Zugabe von 15 ml 2 x EF Einfriermedium wurden 1 ml Aliquots in Kryoröhrchen pipettiert (10 Flaschen ergaben 30 Aliquots), sofort auf Eis gestellt und langsam eingefroren (bei -80 °C in einer Styroporbox). Gelagert wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff bei -196 °C.

### **3.6.5 Auftauen der Feederzellen**

In ein Röhrchen wurden je 3 ml EF-Medium pro aufzutauendem Aliquot vorgelegt. Die Kryoröhrchen wurden schnell in einem 37 °C Wasserbad aufgetaut und die Zellsuspension sofort in das vorgelegte EF-Medium überführt. Nach einer Zentrifugation bei 1000 rpm für 5 Minuten wurde der Überstand verworfen und das Pellet in dem benötigten Volumen EF-Medium resuspendiert. Die Feederzellen waren etwa nach zwei Stunden adhärent.

## **3.7 Primäres ES-Zell-Targeting**

### **3.7.1 Auftauen der Stammzellen**

Einen Tag vor dem Auftauen der ES-Zellen wurden Feederzellen in einer 25 cm<sup>2</sup> Flasche ausgesät (3.6.2). Kurz vor der Zugabe der Stammzellen wurde das EF-Medium der Feederzellen gegen ES-Medium ersetzt. Das Kryoröhrchen der ES-Zellen wurde schnell in einem 37°C Wasserbad aufgetaut und die Zellsuspension danach sofort in 3 ml vorgelegtes ES Medium überführt. Nach Zentrifugation bei 1000 rpm für 5 min wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in 4 ml ES-Medium resuspendiert. Nach einer weiteren Zentrifugation und Resuspendierung wurden die Zellen in die 25 cm<sup>2</sup> Flasche überführt. Die Inkubation erfolgte bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37 °C. Das ES-Medium wurde im Verlauf der ganzen Prozedur jeden Tag gewechselt.

### **3.7.2 Splitten der ES-Zellen**

Waren die ES-Zellen 60-70 % konfluent, wurden sie gesplittet (berühren sich einzelne ES-Zell-Klone, besteht die Gefahr, dass sie differenzieren und so ihre Pluripotenz verlieren). Die Zellen wurden zweimal mit 5 ml 1 x PBS gewaschen und mit 1 ml 1 x Trypsin/EDTA für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 4 ml ES-Medium wurden die Zellen resuspendiert und in ein Röhrchen überführt. Die Zellen wurden bei 1000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert, anschließend in 5 ml ES-Medium resuspendiert und in eine mit Feederzellen vorbereitete 75 cm<sup>2</sup> Flasche überführt.

### **3.7.3 Linearisierung des Targeting Vektors zur Elektroporation**

100 µg jedes Targeting Vektors wurden in 200 µl Gesamtvolumen mit 100 Units Afl II für den HCN2-Kanal und 100 Units Not I für den HCN4-Kanal über Nacht linearisiert. 1 µl des Ansatzes wurden zur Kontrolle der Linearisierung auf ein 0,7 % Agarosegel aufgetragen. Nach Inaktivierung der Enzyme bei 75 °C für 20 Minuten wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion (1.2.2.1) durchgeführt. Die Fällung der DNS (1.2.2.2) und die anschließende Trocknung wurde unter der Sterilbank durchgeführt. Die DNS wurde unter Erwärmung auf 50 °C in 100 µl sterilem PBS gelöst.

### **3.7.4 Elektroporation von Stammzellen**

ES-Zellen, die in 70 cm<sup>2</sup> Flaschen 60-70 % konfluent gewachsen waren, wurden zur Elektroporation vorbereitet. Dafür wurden am Abend vor der Elektroporation Feederzellen

auf 10 Petrischalen ausgesät. Das Medium der 75 cm<sup>2</sup> Flasche wurde abgesaugt und die ES-Zellen zweimal mit je 15 ml PBS gewaschen. Nach Zugabe von 3 ml Trypsin/EDTA wurde 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Suspension wurde mit 7 ml ES-Medium resuspendiert und in ein Röhrchen bei 1000 rpm 5 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 10 ml PBS nochmals resuspendiert und zentrifugiert. Die embryonalen Stammzellen wurden in 700 µl PBS resuspendiert und in eine Elektroporationsküvette mit 0,4 cm Elektrodenabstand (Peqlab) überführt. Mit einer Pipette wurden 100 µl (entspricht etwa 100 µg) des linearisierten Targeting Vektors mit der Zellsuspension gemischt. Die Elektroporation wurde mit dem GenePulser (Biorad) durchgeführt. Die Kapazität wurde auf 500 µF eingestellt, die Spannung auf 230 V. Nach der Elektroporation wurde die Küvette 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Zellen wurden in 9 ml ES-Medium resuspendiert und jeweils 1 ml in jede der 10 Petrischalen pipettiert und durch Schwenken gleichmäßig verteilt. Die Inkubation der Schalen erfolgte bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>.

### **3.7.5 Selektion rekombinierter Stammzellen**

Durch Zugabe von G-418 (Endkonzentration 400 µg/ml), 24 Stunden nach der Elektroporation, erfolgte die Selektion. Alle 24 Stunden erfolgte weiterhin ein Mediumwechsel.

### **3.7.6 Isolation resistenter Klone**

Zuerst wurde eine ausreichende Anzahl 96 well-Platten mit Feederzellen vorbereitet, wobei jeder isolierte ES-Zell-Klon auf zwei Platten gesplittet wurde. Auf einer weiteren 96 well-Platte wurden pro Loch 30 µl PBS vorgelegt. Zur Suche, Isolation und Kontrolle der Klone wurde ein Mikroskop verwendet, welches zuvor mit 80 % Ethanol gereinigt und unter die Sterilbank gestellt wurde. Die Klone wurden mit einer 20 µl Filterspitze umkreist, um sie vom Feederzellverband zu lösen, vorsichtig mit der Pipette eingesaugt und in ein Loch der 96 well-Platte mit dem vorgelegten PBS pipettiert. Waren alle brauchbaren Klone von einer Petrischale auf diese Weise überführt, wurde das ES-Selektions-Medium dieser Platte gewechselt. Nach 96 Klonen oder nach 10 Petrischalen wurden auf jeden einzelnen isolierten Klon 30 µl 2 x Trypsin/EDTA pipettiert und die 96 well-Platte 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Klone wurden durch mehrmaliges Pipettieren resuspendiert. Mit dem Mikroskop wurde die Resuspension überprüft und gegebenenfalls wiederholt. In jedes Loch wurden 60 µl ES-Selektionsmedium gegeben und die Zellen wieder resuspendiert. Jeder Klon

wurde auf zwei 96 well-Platten mit Feederzellen verteilt. Das Medium wurde täglich gewechselt und die Klone auf ihr Wachstum überprüft.

### **3.7.7 Herstellung von Gefrierstocks aus ES-Zellen**

Die erste Platte (Masterplatte) wurde bei einer 60-70 %igen Konfluenz (nach etwa drei Tagen) eingefroren. Dafür wurden die Klone zuerst mit 180 µl PBS gewaschen, dann mit je 30 µl 1 x Trypsin/EDTA für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von Einfriermedium und Resuspendierung der Klone wurden diese schnell für drei Stunden bei –20°C eingefroren. Danach wurden sie bei –80°C eingelagert.

### **3.7.8 Analyse der resistenten Klone**

Platten, die für die Analyse der Klone bestimmt waren, wurden aufgetaut und die Zellen über Nacht bei 55°C lysiert (50 µl Lysepuffer pro Loch). Um einen Verlust der Lösung durch Verdunsten zu verhindern, wurden die Platten abgeklebt und in einer mit feuchten Tüchern ausgelegten Box inkubiert. Am folgenden Tag wurden jedem Loch 100 µl eines Gemisches aus eiskaltem Ethanol (12 ml) und 5 M Natriumchloridlösung (180 µl) zugegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Den Überstand kippte man vorsichtig ab (gefällte DNS haftet am Plastik) und wusch zweimal mit 70 % Ethanol. Nach dem Trocknen (etwa eine Stunde) wurde die DNS für Southern Blots (3.2.6) direkt mit dem entsprechenden Restriktionsenzym (3.2.3.1) über Nacht inkubiert oder für PCR-Analysen über Nacht bei 37 °C in 30 µl in H<sub>2</sub>O gelöst. Die Enzymkonzentration für den Verdau der DNS für Southern Blots betrug 20-25 U/50 µl.

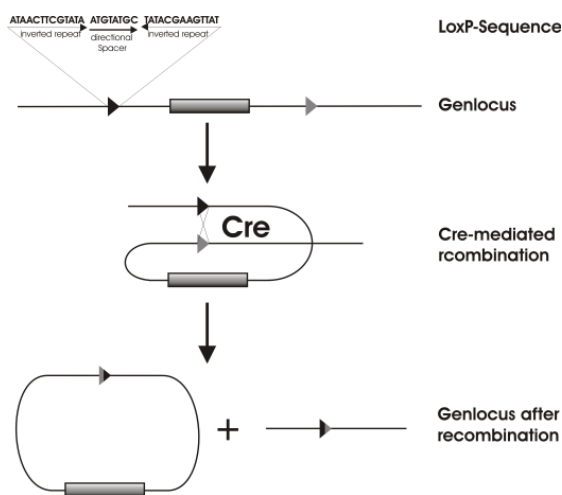
## 3.8 Sekundäres ES-Zell-Targeting

### 3.8.1 Auftauen und Kultivieren positiver Klone

Die zur Transfektion ausgewählten positiven Klone des ersten Targetings wurden im Brutschrank aufgetaut. Sie wurden auf der Masterplatte mit der Pipette resuspendiert und jeweils in ein Loch einer mit Feederzellen vorbereiteten 24 well-Platte transferiert. Nach der Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> wurden sie bei einer Konfluenz von 60 % auf die nächstgrößere Fläche passagiert (6 well-Platte, 25 cm<sup>2</sup> Flasche, 75 cm<sup>2</sup> Flasche). Beim Umsetzen in die 25 cm<sup>2</sup> Flasche wurden aus einer Hälfte der Zellsuspension zwei 1 ml Gefrierstocks in Kryoröhrchen hergestellt.

### 3.8.2 Transiente Transfektion mit Cre-Plasmid

100 µg des zirkulären Cre Rekombinase exprimierenden Plasmids pIC-Cre (Gu, Zou et al. 1993) wurden auf die in 3.2.2.1 beschriebenen Weise gereinigt und gefällt. Jeder Klon wurde mit 20 µg DNS elektroporiert (3.7.4). Im Unterschied zum ersten Targeting wurden die Zellen jedoch in verschiedenen Konzentrationen auf die Petrischalen ausgesät. Pro Klon erhielt man insgesamt 6 Platten mit 2 %, 5 %, zweimal 10 %, 20 % und dem Rest der ES-Zellsuspension.



**Abbildung 3-1 Cre-vermittelte Rekombination**

Zwei gleichgerichtete loxP-Seiten flankieren die zu deletierende Sequenz. Eine rekombinierte loxP-Seite wird zusammen mit dem deletierten Bereich entfernt, die zweite verbleibt am Genlocus.

### **3.8.3 Negative Selektion mit Ganciclovir**

Die Selektion begann 48 Stunden nach der Transfektion. Dann wurden dem Medium 2  $\mu\text{M}$  Ganciclovir zugesetzt und täglich gewechselt.

Die weitere Vorgehensweise zur Isolation, Analyse und Herstellung von Gefrierstocks entsprach dem des ersten Targetings (3.7.6 bis 3.7.8). Nach etwa acht Tagen konnten die ersten Klone isoliert werden.



## **3.9 Erzeugung genetisch modifizierter Mäuse**

### **3.9.1 Verwendete Tiere**

Alle Mäuse wurden auf konventionelle Weise ordnungsgemäß in klimatisierten Tierställen gehalten. Sie erhielten Wasser und Futter ad libitum. Zur Organentnahme wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet.

Die beiden für die Injektion benötigten Mausstämme C57/Bl6 und CD-1 wurden von Charles River (Niederlassung Sulzfeld) bezogen. Die vasektomierten CD-1-Männchen wurden in der französischen Niederlassung von Charles River operiert.

### **3.9.2 Vorbereitung der ausgewählten Klone**

Die zur Injektion ausgewählten Klone wurden aufgetaut und bis zum Erreichen der 6 well-Platte kultiviert (3.7.1/3.7.2). Jeder Klon wurde nun immer in jeweils 3 unterschiedlichen Konzentrationen auf eine neue 6 well-Platte passagiert (z.B. 1:5, 1:10 und 1:20), um am Tag der Injektion nicht zu dicht gewachsene Klone zur Verfügung zu haben.

### **3.9.3 Gewinnung von Blastozysten**

Es wurde jeweils über Nacht ein C57/Bl6-Männchen mit zwei Weibchen des gleichen Stammes verpaart. Am nächsten Morgen wurden die Weibchen auf einen vaginalen Pfropf hin untersucht. Dies wurde wiederum als Tag 0,5 der Schwangerschaft festgelegt. An Tag 3,5 wurden die Weibchen durch zervikale Dislokation getötet, die Uteri isoliert und die Blastozysten ausgespült. Bis zur Injektion wurden sie in M2 Medium (Sigma) bei 37°C und 10 % CO<sub>2</sub> gelagert.

### **3.9.4 Erzeugung pseudoschwangerer Leihmütter**

Um das richtige Stadium des weiblichen Zyklus bestimmen zu können, wurden die Leihmütter mit vasektomierten CD-1 Männchen verpaart und ebenfalls auf einen vaginalen Pfropf hin untersucht. Am Tag 2,5 der Pseudoschwangerschaft wurden den Tieren die injizierten Blastozysten implantiert.

### **3.9.5 Injektion der Stammzellen in die Blastozysten**

Die Blastozysteninjektion und die Reimplantation wurden im Max Planck Institut für Biochemie von Dr. Markus Moser durchgeführt.

### **3.9.6 Verpaarung der Chimären**

Die aus der Schwangerschaft der Leihmütter entstandenen Tiere wurden auf ihre Fellfarbe hin untersucht. Da die verwendete Stammzelllinie männlich war, wurden nur chimäre Männchen mit C57/Bl6 Weibchen verpaart. Nachkommen dieser Männchen deren Fell agouti (gelbbraun) war, wurden genotypisiert (3.2.5.2).

### **3.9.7 Mausezucht**

Die Stammzellen und damit auch die direkten Nachkommen der Chimären waren vom Stamm Sv129. Durch Verpaarung dieser Tiere mit Sv129-WT wurde eine reine Sv129 Zucht erhalten. Um die HCN2cad- und HCN4cad-Kanal auf einen anderen genetischen Hintergrund zu züchten, in unserem Fall C56/Bl6, müssen etwa 10 Generationen jeweils wiederum mit C57/Bl6 WT-Tieren verpaart werden (Markel et al., 1997).

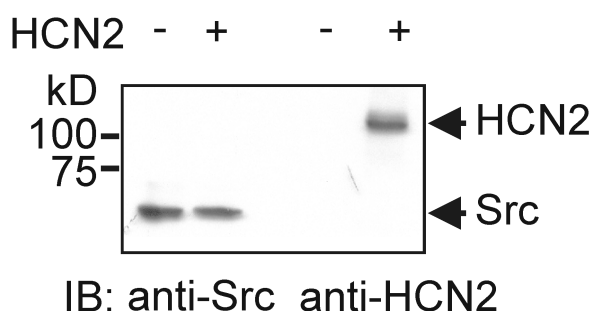
## 4. Ergebnisse

Eine Vielzahl von Ionenkanälen, wie z.B. CNG-Kanäle (Molokanova et al., 1997) interagieren mit Tyrosinkinasen und werden *in vivo* durch Phosphorylierungsreaktionen moduliert und reguliert. Es gibt bislang keine gesicherten Untersuchungen, ob auch HCN-Kanäle mit Tyrosinkinasen stabile Komplexe bilden und durch Phosphorylierung gesteuert werden. Arbeiten von Santoro et al. (Santoro et al., 1997) gaben erste Hinweise auf eine mögliche Interaktionen zwischen dem HCN1-Kanal und der n-Src-Kinase.

### 4.1 Modulation des HCN2-Kanals durch die Src-Kinase

#### 4.1.1 HEK293 Zellen exprimieren endogen die Src-Kinase

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Effekt der Src-Kinase auf transient exprimierte HCN2-Kanäle in HEK293-Zellen untersucht. Wie Abbildung 4-1 zeigt, liegt in diesen Zellen die Src-Kinase endogen vor. Deshalb stellen sie ein geeignetes System für diese Untersuchungen dar.



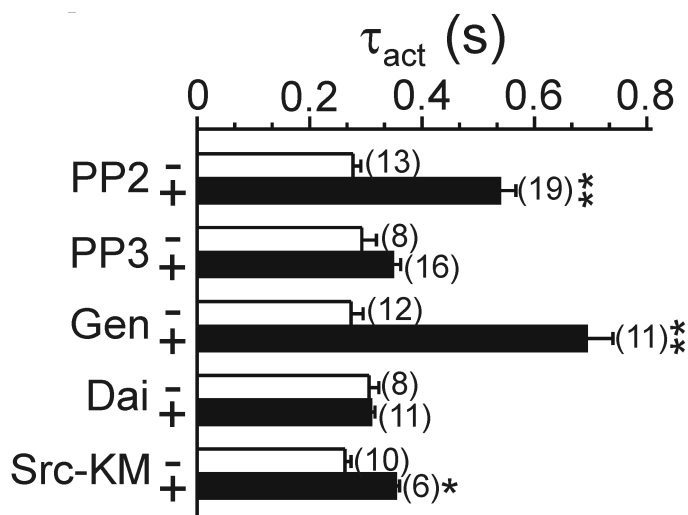
**Abbildung 4-1 Expression der Src-Kinase und des HCN2-Kanals in HEK293-Zellen**

Immunoblot mit Anti-Src und Anti-HCN2. Aufgetragen wurden HEK293-Ganzzelllysate (50 µg Protein pro Spur) die mit pcDNA3-Vektor als Kontrolle (-) oder HCN2 (+) transfiziert wurden. (nach Zong et al. 2005)

#### 4.1.2 Inhibierung der Src-Kinase verlangsamt die Aktivierungskinetik des HCN2-Kanals

Die Präinkubation von HCN2-exprimierenden HEK293-Zellen mit dem Src-Kinasen-Inhibitor PP2 (10 µM) oder Genistein führte zu einer deutlichen Verlangsamung der HCN2-Aktivierungskinetik. Abbildung 4-2 zeigt die Aktivierungs-Zeitkonstanten ( $\tau_{act}$ ) bei -140 mV. Diese erhöhte sich von 277 +/- 14 ms (n=13) bei Kontrollbedingungen auf 538 +/- 29 ms (n=19) durch Zugabe von PP2. PP3, das inaktive Analogon zu PP2, hatte keinen Einfluss auf die Strom-Kinetik. Genistein, ein weiterer Src-Kinase-Inhibitor, verlangsamte den Strom des

HCN2-Kanals. Daidzein (inaktives Genistein-Analogon) hatte keinen Einfluss auf die Aktivierungskonstante des Kanals. HEK293-Zellen, bei denen der HCN2-Kanal mit einer dominant negativen Src-Mutante Src-K295M (Src-KM) kotransfiziert wurden, zeigten einen verlangsamen HCN2-Strom. Abbildung 4-2 zeigt eine Zusammenfassung der Werte für die Zeit-Aktivierungskonstante  $\tau_{act}$  des HCN2-Stroms bei einem Membranpotential von  $-140$  mV.

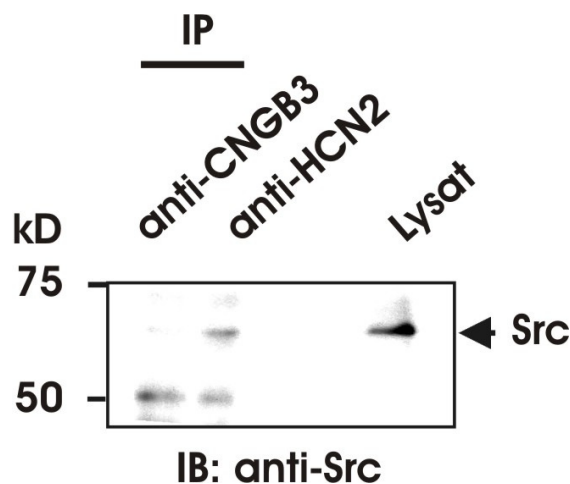


**Abbildung 4-2 Zusammenfassung der Werte für die Zeit-Aktivierungskonstanten ( $\tau_{act}$ )**

Zusammenfassung der Werte von  $\tau_{act}$  des HCN2-Stroms bei einem Membranpotential von  $-140$  mV in Abwesenheit (-) und Anwesenheit (+) von PP2, PP3 (inaktives PP2-Analogon), Genistein (Gen, weiterer Src-Inhibitor) Daidzein (inaktives Genistein-Analogon) und der inaktiven Src-Mutante Src-K295M (Src-KM). Zur Bestimmung der Zeitkonstanten wurden die Stromspuren mit einer monoexponentialen Funktion gefittet. Die Anzahl der Experimente für jede Versuchsreihe ist in Klammern angegeben.  $p < 0,05^{**}$ ,  $p < 0,01$  bei + im Gegensatz zu - (nach Zong et al. 2005).

#### 4.1.3 Der HCN2-Kanal interagiert mit der Src-Kinase und wird phosphoryliert

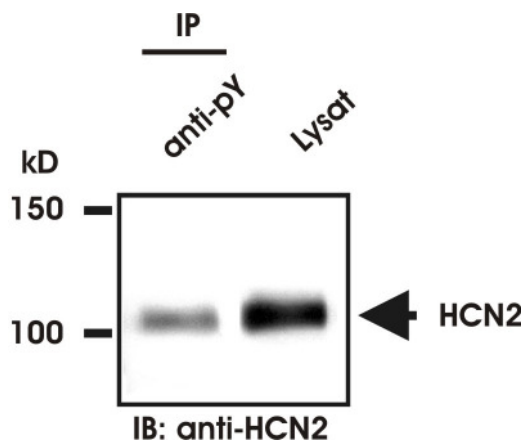
Die Interaktion der Src-Kinase mit dem HCN2-Kanal *in vivo* wurde durch Ko-Immunopräzipitation aus totalem Maus-Gehirn-Lysat untersucht. Ein Aliquot des Lysats wurde über Nacht mit einem anti-HCN2 Antikörper und einem Kontroll-Antikörper (anti-CNGB3) inkubiert. Der Nachweis der Interaktion erfolgte im Immunblot durch die Detektion der Src-Kinase. Die Src-Kinase konnte mit einem anti-HCN2 Antikörper, nicht jedoch mit einem anti-CNGB3 Antikörper, präzipitiert werden (Abbildung 4-3). Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die Src-Kinase *in vivo* am HCN2-Kanal gebunden vorliegt.



**Abbildung 4-3 Koimmunopräzipitation der Src-Kinase mit anti-HCN2-Antikörper**

Aus Mausgehirn-Lysat (1 mg) wurde entweder mit anti-HCN2- oder Kontroll-Antikörper ( $\alpha$ -CNGB3) Src-Kinase präzipitiert und geblottet. Der Immunblot wurde mit einem anti-Src-Antikörper durchgeführt (nach Zong et al. 2005).

Weiterhin konnte der HCN2-Kanal in Gegenwart von 200  $\mu$ M Pervanadat (Phosphatasen-Inhibitor) durch anti-phospho-Tyrosin Antikörper aus totalem Maus-Gehirn-Lysat präzipitiert werden (Abbildung 4-4). Dieses Experiment zeigt, dass der Kanal in Gehirn-Gewebe einen Phosphotyrosinrest enthält.



**Abbildung 4-4 Detektion des phosphorylierten HCN2-Kanals in Maus-Gehirn**

Immunopräzipitation des HCN2-Kanals aus Maus-Gehirn Zelllysate (1 mg Protein) mit einer Mischung aus zwei verschiedenen anti-Phospho-Tyrosin Antikörpern (10  $\mu$ g Anti-PY und 10  $\mu$ g p-Tyr-100) in Anwesenheit von 200  $\mu$ M des Phosphataseinhibitor Pervanadat. Nachweis des HCN2-Kanals mit einem anti-HCN2-Antikörper im Immunblot.

#### 4.1.4 Identifizierung der Interaktionsregionen des HCN2-Kanals und der Src-Kinase

Um die Domänen zu identifizieren, die für eine Interaktion zwischen der Src-Kinase und dem HCN2-Kanal essentiell sind, wurde ein „Yeast Two Hybrid“ (YTH)-Screen durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine spezifische Interaktion zwischen dem ganzen C-Terminus des HCN2-Kanals und der Src-Kinase stattfand. Durch eine Reihe von Bait-Vektor-Konstrukten konnte diese Zielsequenz für eine Interaktion auf die Region zwischen der C'-Helix des C-Linkers bis zum C-Terminus der CNBD eingeengt werden (Zong et al., 2005). Das gleiche Resultat wurde erhalten, wenn anstelle der vollständigen Src-Kinase nur deren SH3-Domäne als Bait verwendet wurde.

Um die YTH-Daten zu belegen, wurden Pull-Down-Versuche durchgeführt. Es konnte auch in dieser Versuchsreihe eine Einengung der Bindungsdomäne des HCN2-Kanals, auf den Bereich der C'-Helix des C-Linkers bis zum C-Terminus der CNBD (Abbildung 4-5 (A)), mit der Src-Kinase gezeigt werden. Zu diesem Zweck wurde die ganze Src-Kinase als Myc-Fusionsprotein zusammen mit je einem der GST-Fusionsproteine, dem HCN2-C-Terminus oder HCN2-C-BD (C-Linker mit Helices A' bis F' und CNBD mit Helices A bis C und  $\beta$ -Faltblätter  $\beta$ 1- $\beta$ 8 (Abbildung 4-5 (A))), in HEK293-Zellen überexprimiert. Durch Bindung des GSTs an Gluthation-Sepharose und dem Nachweis von Myc im Immunblot konnten die Interaktionen der Src mit jedem der beiden GST-Fusionsproteine gezeigt werden (Abbildung 4-5 (B)). Dabei wurde zuerst die SH3-Domäne der Src-Kinase als GST-Fusionsprotein exprimiert und die Interaktion durch Nachweis des kompletten HCN2-Kanals überprüft.



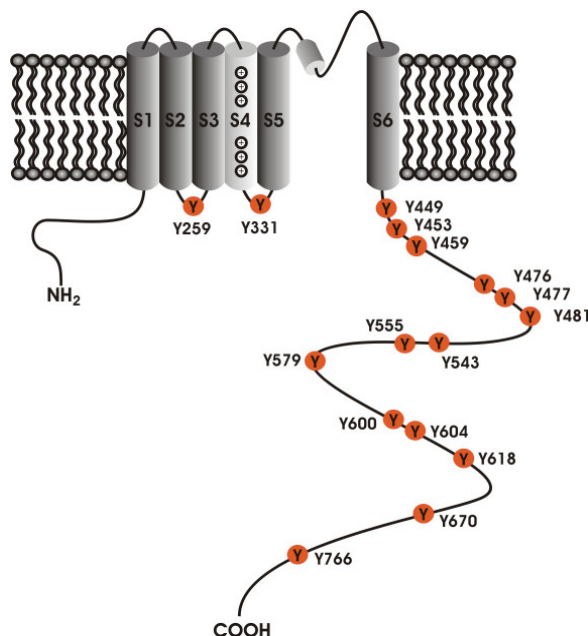
In einem inversen Experiment konnte auch die spezifische Interaktion zwischen der SH3-Domäne der Src-Kinase mit dem Wildtyp-HCN2-Kanal gezeigt werden (Abbildung 4-6). Dazu wurde der Wildtyp-Kanal durch das GST-Fusionsprotein der SH3-Domäne präzipitiert. Der Nachweis im Immunblot erfolgte über den anti-HCN2-Antikörper.



Der Wildtyp HCN2-Kanal bindet an die SH3-Domäne der Src-Kinase. Mit HCN2 transfizierte HEK-Zelllysate wurden mit GST (als Kontrolle) und dem Fusionsprotein GST-SH3 inkubiert. Der Nachweis des HCN2-Kanals erfolgte im Immunblot mittels eines anti-HCN2 Antikörpers (nach Zong et al. 2005).

#### 4.1.5 Die Src-Kinase reguliert den HCN2-Kanal durch die Phosphorylierung des Tyr<sup>476</sup>

Die Primärsequenz des HCN2-Kanals enthält 24 Tyrosinreste. Wie Abbildung 4-7 zeigt, liegen davon jedoch nur 16 im Intrazellulärraum und könnten deshalb ein Ziel für eine Phosphorylierung durch eine Protein-Tyrosin-Kinase wie die Src darstellen.

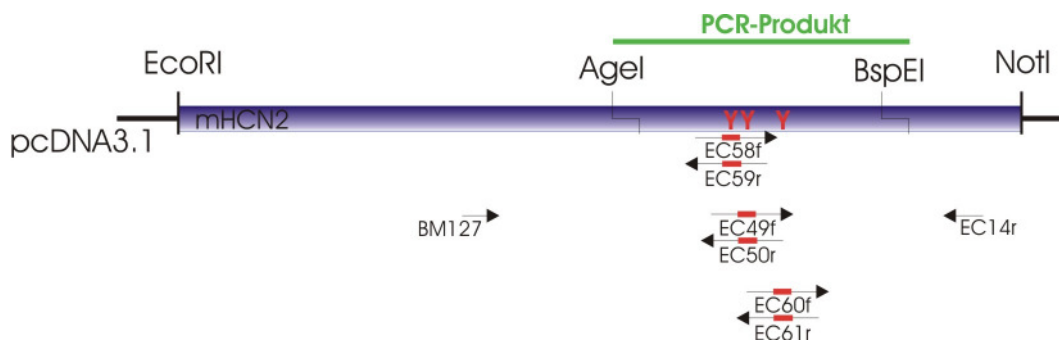


**Abbildung 4-7 Die Tyrosin-Reste im HCN2-Kanal**

16 Tyrosin-Reste liegen im HCN2-Kanal in dem für die Src-Kinase zugänglichen Intrazellulärraum der Zelle.

Um das Ziel der Phosphorylierungsreaktion der Src-Kinase zu identifizieren wurden die intrazellulären Tyrosinreste des HCN2-Kanals systematisch durch Mutations-PCRs zu Phenylalaninresten mutiert. Weiterhin wurden auch Kombinationen von bis zu neun Tyrosin-Mutationen untersucht.

Die Mutations-PCRs wurden über die Restriktionsendonukleasen Age I und BspE I in die Wildtyp-HCN2-Sequenz eingebracht (Abbildung 4-8).

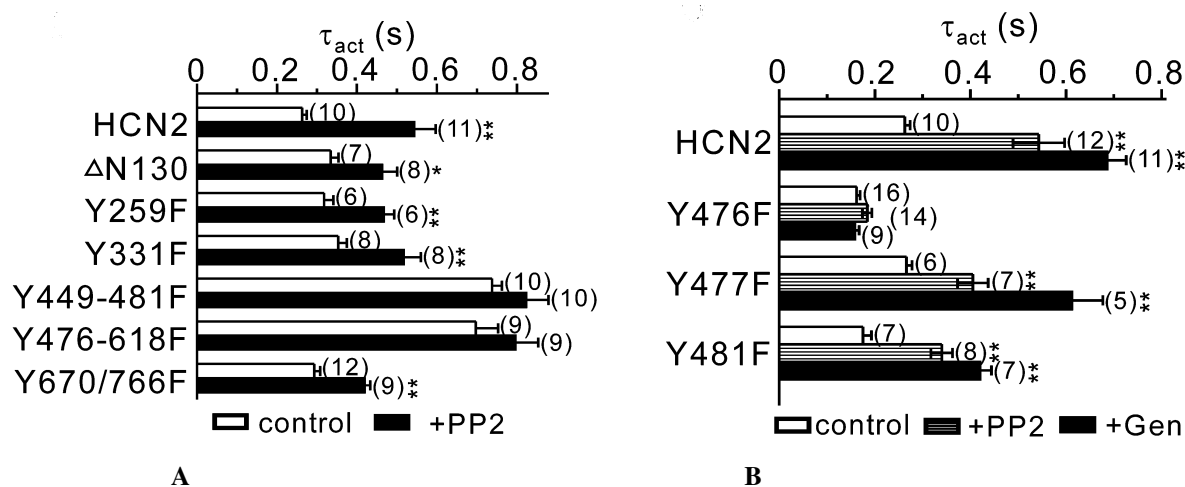


**Abbildung 4-8 Klonierungsschema der Mutanten Tyr 476, 477 und 481**



Die Mutanten wurden elektrophysiologisch auf ihre Sensitivität gegenüber dem Src-Kinase Inhibitor PP2 getestet. In Abbildung 4-9 (A) sind die Werte der Aktivierungskonstante  $\tau_{act}$  für einige der Mutanten zusammengefasst. Mutanten, deren N-Terminus trunkiert wurde, die Mutationen in der Zytoplasmatischen Schleife (Y291F, Y331F) oder im distalen C-Terminus aufwiesen, zeigten weiterhin eine Sensitivität gegenüber PP2.

Eine Mutante, deren sechs Tyrosine im C-Linker (Y449-481F) zu Phenylalanine mutiert wurden, zeigten keine Sensitivität gegenüber dem Src-Kinasen Inhibitor mehr. Auch eine neunfach Mutante aus den letzten drei Tyrosinresten im C-Linker, sowie allen sechs Tyrosinresten der CNBD (Y476-618F) wurde nicht mehr durch PP2 moduliert. Daraus konnte man schließen, dass eine der drei in beiden Mutanten veränderten Reste (Y476F, Y477F und Y481F) für diesen Effekt ausschlaggebend ist. Bei der Einzelanalyse dieser drei Tyrosinreste konnte gezeigt werden, dass Tyr<sup>476</sup> allein für den Effekt von PP2 (oder Genistein) ausschlaggebend war. Kanäle, mit Mutationen der Reste Tyr<sup>477</sup> und Tyr<sup>481</sup> in Phenylalanine zeigten bei Zugabe von PP2 keine Änderung gegenüber dem Wildtyp-Kanal (Abbildung 4-9 (B)).



**Abbildung 4-9 (A)** Effekt von 10  $\mu$ M PP2 auf die Aktivierungskinetik ( $\tau_{act}$ ) von einigen HCN2-Mutanten. Einer Mutante mit trunkiertem N-Terminus ( $\Delta$ N130, die 130 N-terminalen Aminosäure-Reste wurden deletiert), die Punktmutanten Y259F und Y331F, Y449-481F (6-fach Mutante, in der die Tyrosine Tyr<sup>449</sup>, Tyr<sup>453</sup>, Tyr<sup>459</sup>, Tyr<sup>476</sup>, Tyr<sup>477</sup> und Tyr<sup>481</sup> durch Phenylalanine ersetzt wurden) und Y476-618F (9-fach Mutante, in der die Tyrosine Tyr<sup>476</sup>, Tyr<sup>477</sup>, Tyr<sup>481</sup>, Tyr<sup>543</sup>, Tyr<sup>555</sup>, Tyr<sup>579</sup>, Tyr<sup>600</sup> und Tyr<sup>618</sup> durch Phenylalanine ersetzt wurden). Bei Y670/766F handelt es sich um einen HCN2-Kanal, dessen distal im C-Terminus liegende Tyrosine (Tyr<sup>670</sup> und Tyr<sup>766</sup>) in Phenylalanine geändert wurden.

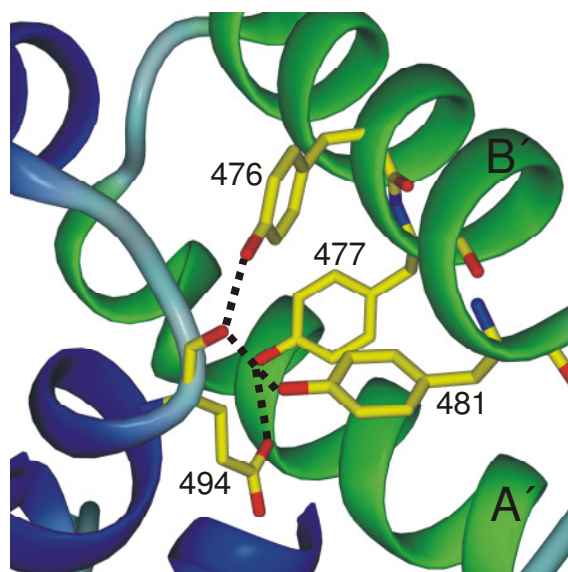
**(B)** Effekt von 10  $\mu$ M PP2 und 100  $\mu$ M Genistein (Gen) auf  $\tau_{act}$  des HCN2, HCN2-Y476F, HCN2-Y477F und HCN2-Y481F (nach Zong et al. 2005).

#### 4.1.6 Mutation des Tyr<sup>554</sup> im HCN4-Kanal

Das Tyr<sup>476</sup> des HCN2-Kanals ist in der B'-Helix des C-Linkers lokalisiert (Abbildung 4-6).

Wie aus der Kristallstruktur des C-Linkers und der CNBD des HCN2-Tetramers hervorgeht,

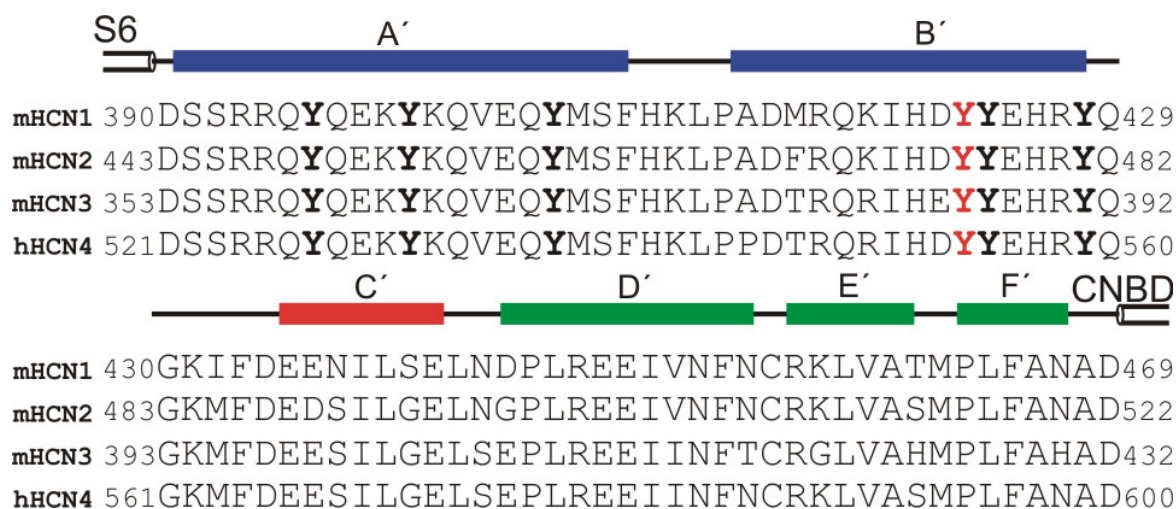
bildet Tyr<sup>476</sup> eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Carbonyl-Rückgrat des Glu<sup>494</sup> in der C'-Helix der benachbarten Kanal-Untereinheit aus.



**Abbildung 4-10 Kristallstruktur der A'- und B'-Helix des HCN2-Kanals**

Die Tyrosin-Reste Y476, Y477 und Y481 gehen Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Glu<sup>494</sup> der C'-Helix der benachbarten Untereinheit ein (Zagotta et al. 2003).

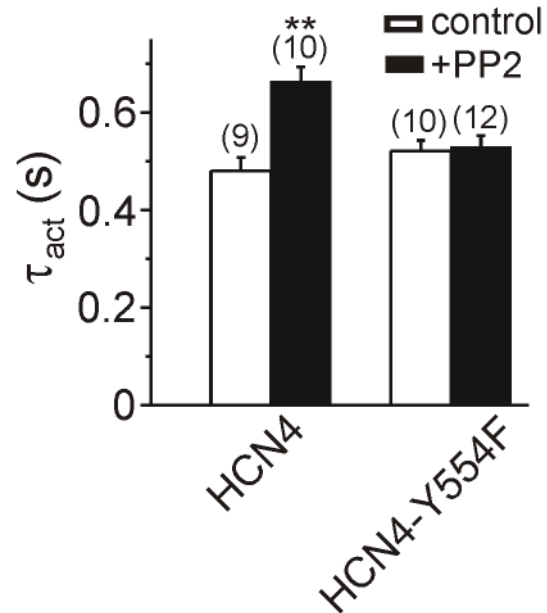
Abbildung 4-11 zeigt einen Sequenzvergleich der Aminosäuren des C-Linkers der HCN-Kanal-Familie. Tyr<sup>476</sup> ist unter den HCN-Kanälen hoch konserviert. Daher liegt es Nahe, dass die Regulation der HCN-Kanäle durch die Src-Kinase ein generell anzutreffendes Phänomen ist.



**Abbildung 4-11 Sequenzvergleich des C-Linkers der HCN-Kanäle**

Aminosäuren-Sequenzvergleich des C-Linkers zwischen den vier Isoformen der HCN-Kanäle. Der Tyr<sup>476</sup>-Rest des HCN2-Kanals ist in der HCN-Familie hoch konserviert.

Auch der HCN4-Strom wird durch PP2 verlangsamt. Das zum Tyr<sup>476</sup> im HCN2-Kanal analoge Tyrosin des HCN4-Kanals (HCN4-Y554F) wurde in ein Phenylalanin mutiert. Es zeigte sich, dass durch diese Änderung im HCN4-Kanal der Effekt des PP2 aufgehoben werden konnte (Abbildung 4-9).



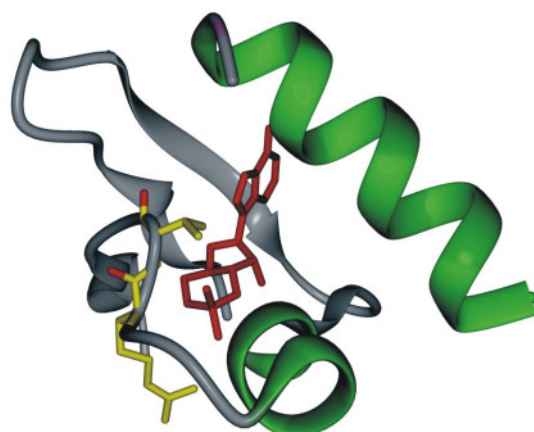
**Abbildung 4-12**  $\tau_{act}$  des Wildtyp HCN4-Kanals und der HCN4-Y554F-Mutante bei  $-140$  mV in Abwesenheit und Anwesenheit von PP2 (nach Zong et al. 2005).

## 4.2 Generierung von Mäusen mit cAMP-defizienten HCN2/HCN4-Kanälen

Die Aktivierung der HCN-Kanäle ist ein allosterischer Prozess der aus zwei Komponenten besteht. Da die beiden Komponenten, die spannungsabhängige und die ligandenabhängige (cAMP), eng miteinander verknüpft sind, ist es in nativen Kanälen nicht möglich die Modulation der Kanäle durch cAMP, ohne den Einfluss der spannungsabhängigen Aktivierung zu untersuchen. Ziel dieser Arbeit ist die Erzeugung von Mauslinien mit HCN2- und HCN4-Kanalmutanten, deren cAMP-Affinität soweit reduziert ist, dass sie rein spannungsabhängig aktiviert werden. Anhand dieser Mauslinien kann dann *in vivo* die physiologische Relevanz der cAMP-Modulation dieser Kanäle untersucht werden.

Mutationsanalysen an den verwandten CNG-Kanälen haben gezeigt, dass zwei hoch konservierte Aminosäurereste, Arginin und Threonin (R591 und T592 im HCN2-Kanal (Abbildung 4-13)), in der CNBD essentiell für die Bindung von Zyklonukleotiden sind (Altenhofen et al., 1991; Kaupp and Seifert, 2002; Tibbs et al., 1998). Die Mutation dieser Aminosäuren führt in CNG-Kanälen zum Verlust der Zyklonukleotid-Sensitivität. Die CNBDs von CNG- und HCN-Kanälen zeigen hohe Homologien und die beiden für die Bindung der Zyklonukleotide essentiellen Aminosäuren sind unter den HCN-Isoformen hoch konserviert (HCN2: R591 und T592/HCN4: R669 und T670).

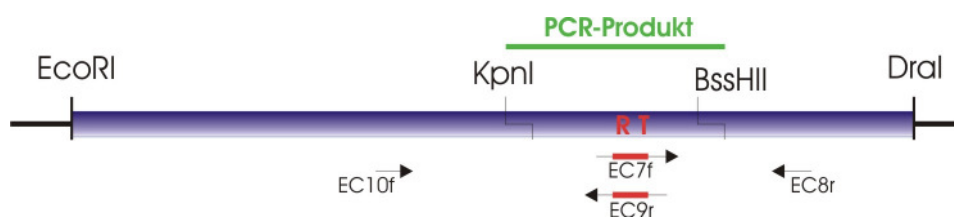
Diese beiden Mutationen (Arginin in Glutamat und Threonin in Alanin) sollten für die Untersuchung *in vivo* für den HCN2- und HCN4-Kanal in Targeting-Vektoren kloniert werden, damit diese durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen eingebracht werden können. Durch Blastozysteninjektion dieser veränderten ES-Zellen können zwei Mauslinien erzeugt werden, von denen eine einen **cAMP-defizienten HCN2-** (HCN2**cad**) und eine den **cAMP-defizienten HCN4-Kanal** (HCN4**cad**) trägt.



mHCN2	LLTRGRRTASVRAD
mHCN4	LLTRGRRTASVRAD
mHCN3	LLTRGRRTASVRAD
mHCN1	LLTRGRRTASVRAD

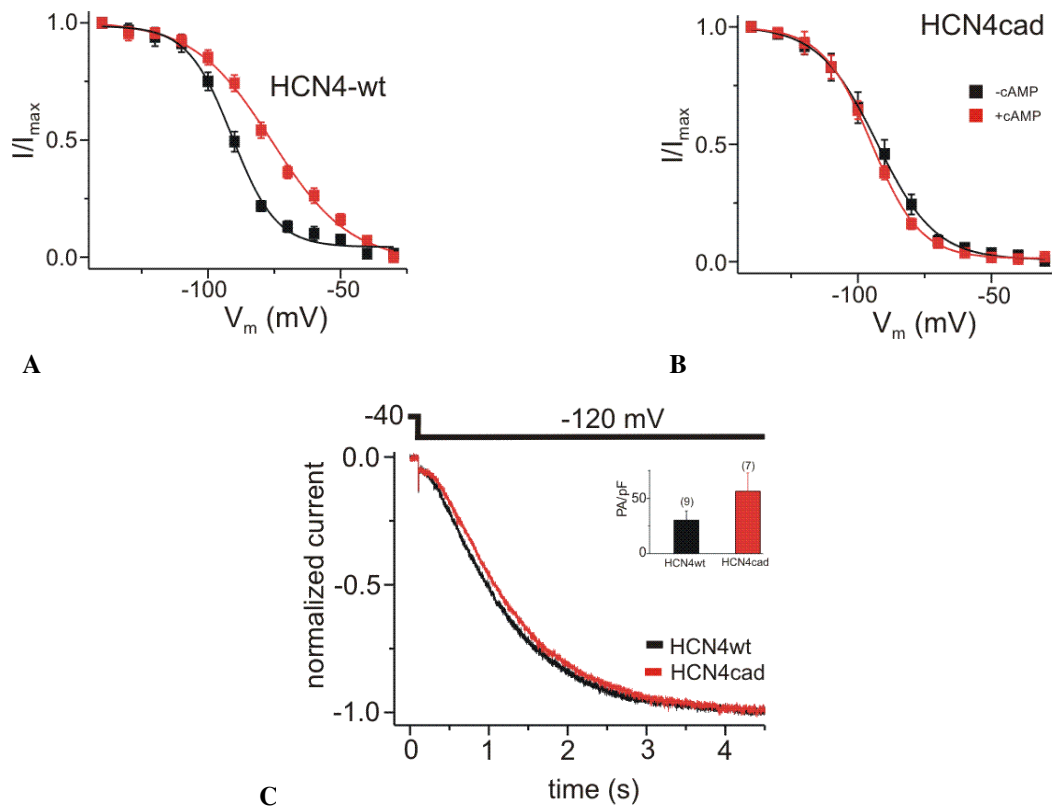
**Abbildung 4-13 Arginin und Threonin (gelb unterlegt) sind essentiell für die Bindung von cAMP**

Um den Effekt dieser Mutationen zu überprüfen, wurden zuerst in der cDNS des menschlichen HCN4-Kanals die für die Bindung von cAMP essentiellen Aminosäuren mutiert (Abbildung 4-13). Diese mutierte cDNS wurde zur transienten Expression in den pIRES-eGFP-Vektor kloniert (Abbildung 4-14) und anschließend in HEK293-Zellen transfiziert.



**Abbildung 4-14 Klonierung des hHCN4cad-Kanals**

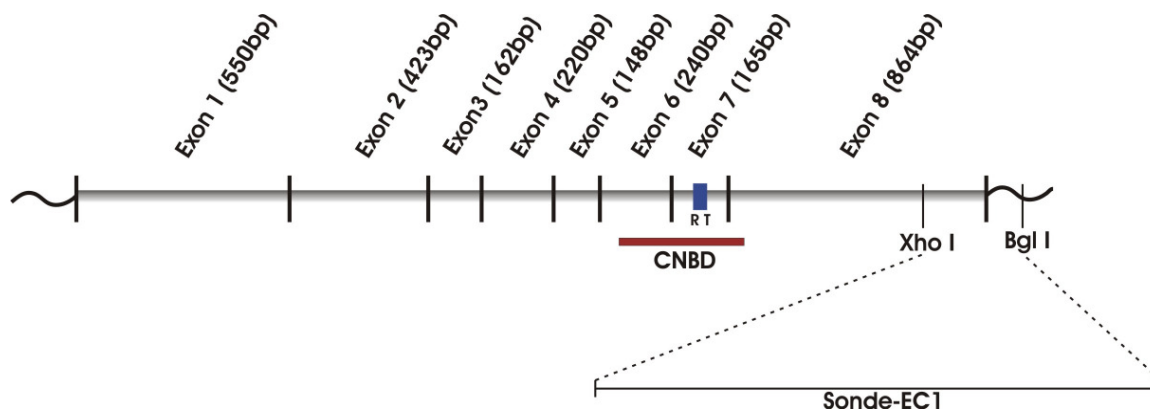
Danach wurden die Kanäle elektrophysiologisch untersucht. Abbildung 4-15 (A) zeigt die Modulation des HCN4-Wildtypkanals durch cAMP. In Gegenwart des Zyklonukleotids wird die halbmaximale Aktivierungskurve um etwa 10 mV nach rechts verschoben. In Abbildung 4-15 (B) (bei der HCN4-R669E/T670A-Mutante (HCN4cad)) wird die Kurve der halbmaximalen Aktivierung nicht mehr verschoben. Es findet keine Modulation durch cAMP statt.



**Abbildung 4-15** (A)  $I/I_{\max}$  des HCN4-WT in An- und Abwesenheit von cAMP (B)  $I/I_{\max}$  des HCN4cad in An- und Abwesenheit von cAMP (C) normalisierter Strom des Wildtyp-HCN4- (schwarz) und des HCN4cad-Kanals (rot).

#### 4.2.1 Detektion der genomischen Sequenz des HCN2-Kanals

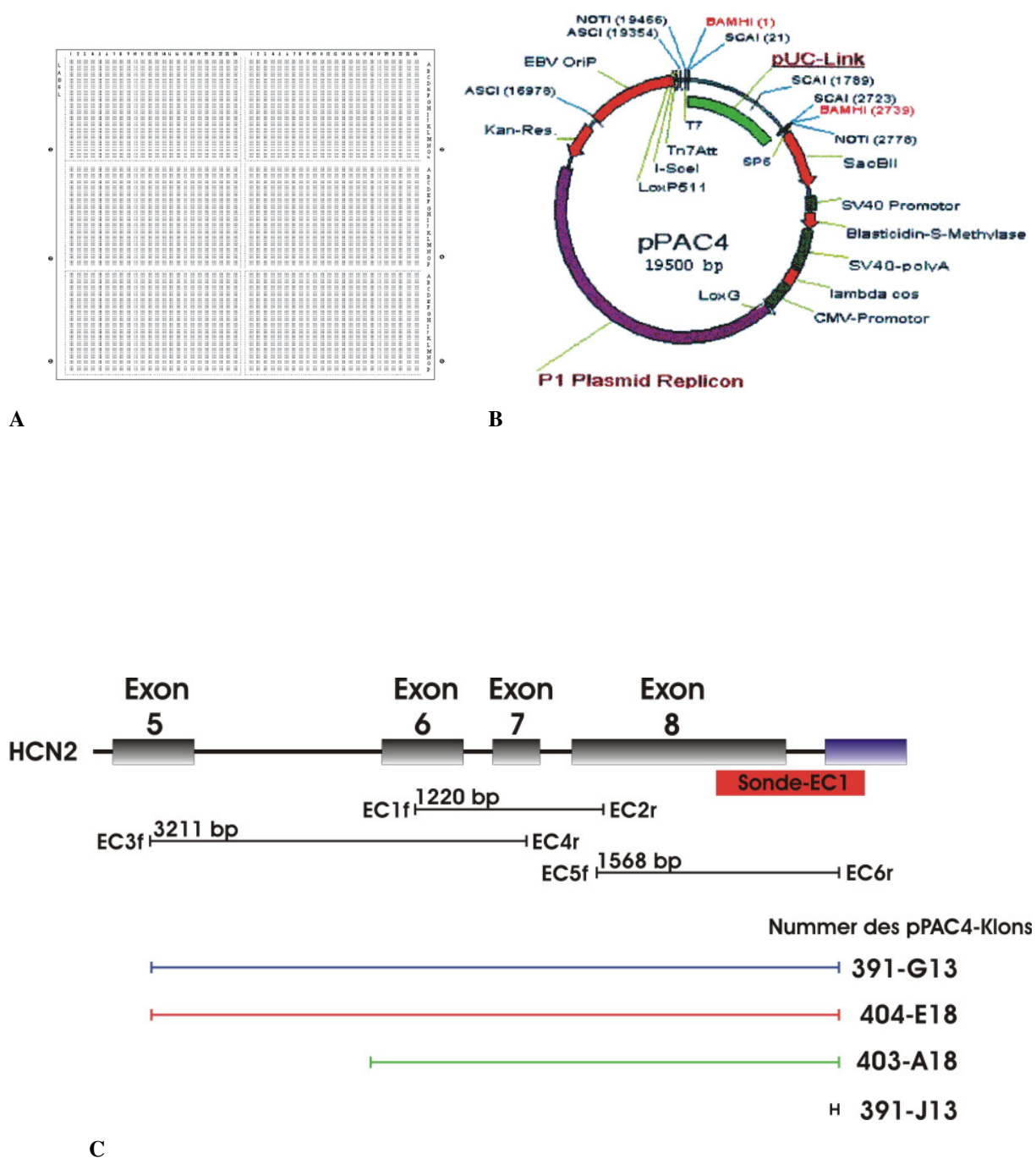
Für die Herstellung eines Targeting-Vektors zur homologen Rekombination in embryonalen Stammzellen wird die genomische DNS benötigt. Dafür wurde eine genomische Maus-DNS-Bibliothek gescreent. Quelle dieser Bibliothek war die genomische Milz-DNS der Mauslinie 129/SvevTACfBr (Osoegawa et al. 2000). Die Bibliothek bestanden aus sieben Membranen (Abbildung 4-17 (A)), wobei auf jeder Membran Fragmente des Maus-Genoms doppelt aufgetragen waren. Daraus ergaben sich etwa 36864 (18432 x 2) Spots auf jeder Membran.



**Abbildung 4-16 HCN2-Kanal der Maus mit Sonde-EC1**

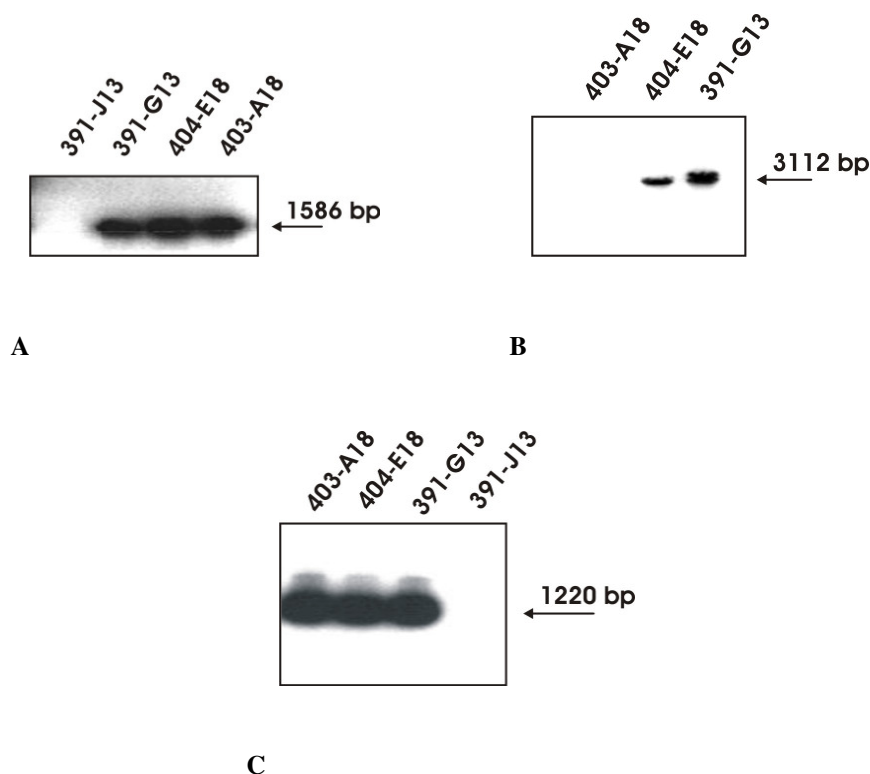
Als Sonde zum screenen dieser Bibliothek wurde die Sonde-EC1 (Abbildung 4-16) durch einen Restriktionsverdau der HCN2-cDNS mit den Restriktionsendonukleasen Xho I und Bgl I hergestellt und durch ein präparatives Agarosegel aufgereinigt. Für die Untersuchung von genomischer DNS musste die Sonde in einem Exon liegen. Durch Hybridisierung der Bibliotheks-Membranen mit der durch  $P^{32}$ -dCTP radioaktiv markierten Sonde-EC1 (Abbildung 4-16) konnten bestimmte Klone identifiziert werden, die unter anderem den Bereich dieser Sonde aus dem Mausgenom enthielten. Die Maus-DNS-Fragmente waren in „P1-derived artificial chromosomes“ (pPAC) kloniert und enthielten jeweils etwa 147 kb-Fragmente.

Nach der Identifizierung mehrerer Klone wurden diese mittels PCR-Analysen auf die Vollständigkeit der für einen Targeting-Vektor benötigten genomischen DNS hin untersucht (Abbildung 4-17 (C)/4-18).



**Abbildung 4-17** (A) Membran mit Spots des Maus Genoms (B) pPAC4-Plasmid (C) Der Targeting-Vektor für den HCN2-Kanal liegt vom Intron zwischen Exon 5 und 6 bis in den Genbereich 3' des Exons 8. Mittels PCR-Analysen wurde untersucht, ob dieser gesamte Bereich in den jeweiligen pPAC4-Klonen vorhanden war.





#### Abbildung 4-18 PCR-Analyse der pPAC4-Klone durch PCR

Durch drei PCR-Analysen wurden die pPAC4-Klone auf Vollständigkeit der DNS-Sequenz für einen HCN2cad-Targeting-Vektor untersucht. Mit den Primerpaaren (A) EC5f bis EC6r, (B) EC3f bis EC4r und (C) EC1f bis EC2r konnte der gesamte Bereich überprüft werden.

### 4.2.2 Erstellung des Targeting-Vektors für den HCN2-Kanal

Der HCN2-Targeting-Vektor wurde in drei Schritten konstruiert. Zuerst wurde aus dem pPAC4-Klon 391-G13 durch einen Restriktionsverdau mit der Restriktionsendonuclease BamHI ein 7000bp-Fragment, das die Exons 6 bis 8 des HCN2-Kanals und 2698bp des im Mausgenom 3' des HCN2-Kanals liegenden Gens RIKEN 1110018N15 (eine mitochondriale RNA-Polymerase) umfasste, herausgeschnitten. Dieses Fragment wurde in den pUC18-Vektor über BamHI subkloniert. Die Mutation der beiden Aminosäuren im Exon 7 erfolgte durch eine Mutation der für diese Aminosäuren kodierenden Basen mittels PCR (Primer siehe Anhang). Das so entstandene PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen Bcl I und Bsm I sequentiell verdaut. Auch aus dem 7000 bp-Fragment im pUC18-Vektor wurde die Sequenz zwischen Bcl I und Bsm I durch sequentiellen Verdau entfernt. Danach wurde das PCR-Produkt mit den mutierten Basen über diese beiden Restriktionsstellen in das 7000 bp-Fragment ligiert.

Über die 3' der loxP und neo-tk-Kassette liegende Erkennungssequenz der Cla I Restriktionsendonuclease im pBluescript/neo-tk-Vektor wurde durch einen Linker eine

weitere Not I Schnittstelle eingefügt, um so die komplette neo-tk-Kassette mit den je 3' und 5' liegenden 34 bp loxP-Seiten über Not I aus dem Plasmid schneiden zu können. Über dieses Restriktionsenzym konnte die Kassette in den Targeting-Vektor eingefügt werden. Diese befand sich im Exon 8, nach dem Stop-Codon, jedoch noch vor der Polyadenylierungssequenz (AATAAA) in der 3'-nichttranslatierten Region.

Der komplette durch PCR erstellte Bereich und sämtliche durch die Klonierungen entstandenen Übergänge wurden sequenziert, um mögliche zufällige Mutationen auszuschließen.

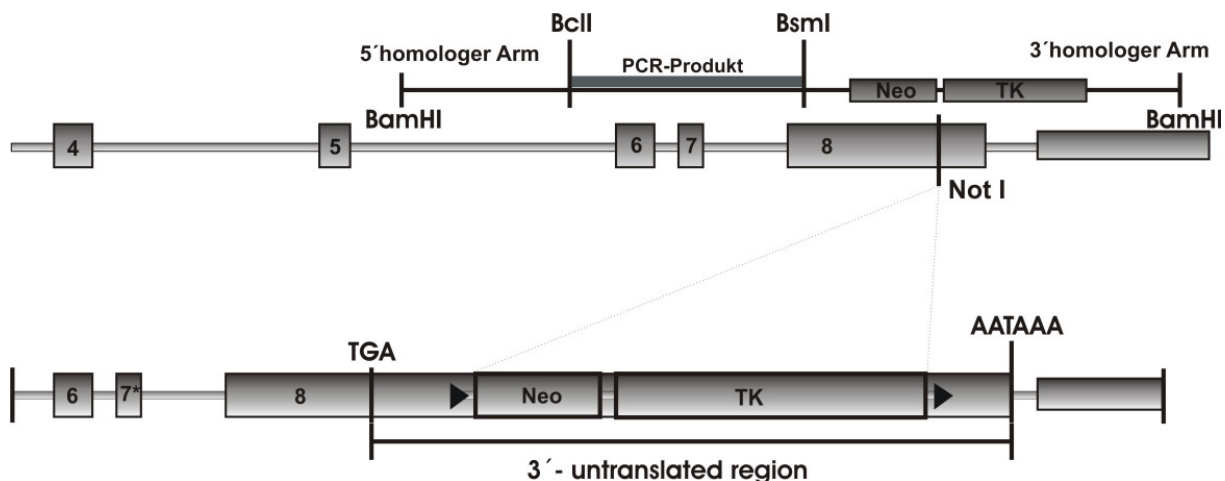


Abbildung 2-19 Aufbau des Targeting-Vektors für den HCN2-Kanal

#### 4.2.3 Erstellung des Targeting-Vektors für den HCN4-Kanal

Anders als bei der Konstruktion des HCN2-Targeting-Vektors war die genomische Maus-DNS für den HCN4-Kanal bereits als pBAC-Klon („bacterial artificial chromosome“) vorhanden. Beim HCN4-Targeting-Vektor wurden zuerst die Exons 5 bis 8 der genomischen HCN4-DNS über die Restriktionsendonuklease EcoRI (9847 bp) in den pBluescript-Vektor (pBSEco) kloniert. Ausgehend von diesem pBSEco-Plasmid wurden die Exons 5 und 6 über die Restriktionsenzyme EcoR I und Hind III in den pGEM9-Vektor umkloniert. Ein zweites pGEM9-Plasmid aus dem Hind III- bis Nsi I- Fragment (Exon 7 und 8 aus pBSEco) des HCN4-Kanals wurde erstellt. Die Mutation der Aminosäuren Arginin und Threonin erfolgte wiederum durch eine überlappende Mutations-PCR mit den Primerpaaren RM42f und RM43r. Wie beim HCN2-Kanal befinden sich diese für die Bindung von cAMP essentiellen Reste im Exon 7 des HCN4-Kanals. Dieses Mutations-PCR-Fragment ersetzte die Wildtyp DNS des im pGEM9 subklonierten Hind III bis Nsi I -Fragments über die Restriktionsenzyme Acc65 I (5' des Exon 7) und Sph I (3' des Exon 7). Nach dem Ersatz dieser DNS konnte nun das Hind III/ Nsi I-Fragment, wiederum über diese Restriktionsstellen, in den pGEM-Vektor, mit der EcoR

I/Hind III-DNS integriert werden. Die Integration der neo-tk-Kassette und deren 5'- und 3'-loxP-Seiten erfolgte über die Restriktionsenzyme BamH I und Cla I. Anders als beim HCN2-Kanal wurde die Kassette nicht nach dem Exon 8 sondern in das Intron zwischen Exon 6 und Exon 7 integriert.

Auch beim HCN4-Kanal wurden alle wichtigen Bereiche des Targeting-Vektors sequenziert. Dabei handelte es sich um das PCR-Produkt mit der Mutation, die Restriktionsstellen zum Einsetzen dieses PCR-Produkts in den Vektor, die loxP-Seiten sowie alle entstandenen Übergänge.

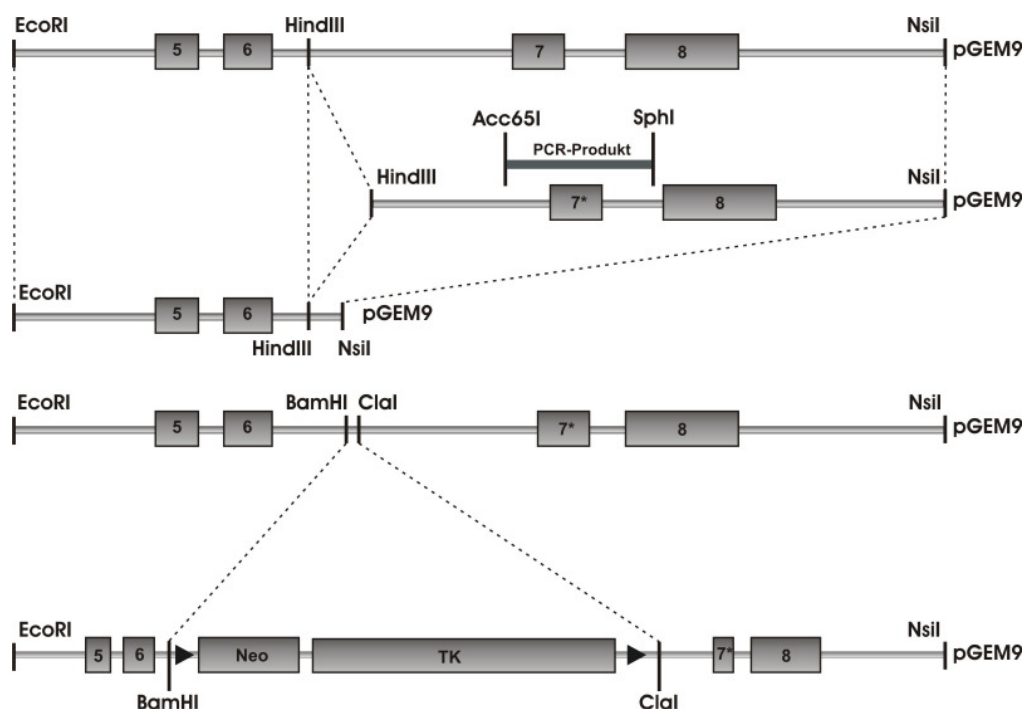


Abbildung 2-20 Aufbau des Targeting-Vektors für den HCN4-Kanal

#### 4.2.4 ES-Zell-Targeting

Die Erzeugung der HCN2cad- und HCN4cad-Mäuse erfolgte durch „gene targeting“. Dieser Begriff bezeichnet einen Vorgang, bei dem durch homologe Rekombination, mit eingeschleuster mutierter DNS das entsprechende Gen in Stammzellen zielgerichtet verändert wird. Da nur pluripotente ES-Zellen die Keimbahn bilden können, ist der Pluripotenz der kultivierten Stammzellen besondere Bedeutung zu schenken. Die Techniken und Maßnahmen hierfür sind unter 3.5 beschrieben.

#### 4.2.5 Primäres ES-Zell-Targeting

Es wurden Stammzellen der 15. Passage verwendet. Nach drei Tagen und einer weiteren Passage waren die Stammzellkolonien ausreichend expandiert, um mit den HCN2- und HCN4-Targeting-Vektoren elektroporiert zu werden (3.7.4). Hierfür wurden je 100 µg des mit Afl II (HCN2) oder Not I (HCN4) linearisierten Vektors verwendet (3.7.3). Die für jeden Kanal auf zehn Petrischalen ausgesäten ES-Zellen wurden nach 24 Stunden mit G-418-Selektionsmedium inkubiert. Nach weiteren fünf Tagen mit täglichem Wechsel des Selektionsmediums konnte mit der Isolation der einzeln gewachsenen Klone begonnen werden (3.7.6). Isoliert wurden nur Klone, die unter dem Mikroskop klar umrandet waren (Abb. 4-20). Klone mit ausgefranzten Rändern wurden entfernt, damit sie die Platten nicht überwachsen konnten. Im Verlauf von neun Tagen wurden insgesamt 364 Klone für den HCN2-Kanal und 319 Klone für den HCN4-Kanal auf 96 well-Platten vereinzelt. Danach waren keine guten Klone mehr zu erkennen. Auch die Gefahr, daß schon gepickte Klone nochmals wachsen und ein zweites mal isoliert werden, war dann groß. Die Masterplatten wurden bei einer Konfluenz der ES-Zellen von 60-70 % bei -80 °C gelagert. Die drei Replikplatten wurden bis zur Konfluenz der Stammzellen kultiviert. Nach der Lyse der ES-Zellen (3.7.8) konnte die erhaltene DNS durch Southern Blots und PCR analysiert werden.

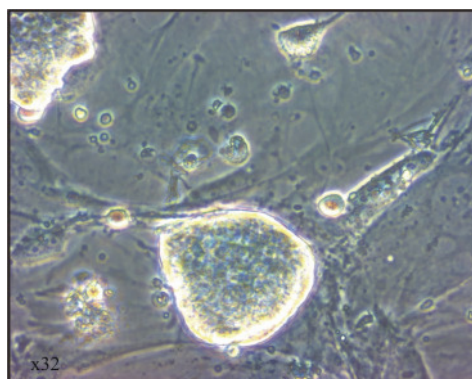


Abbildung 4-21 ES-Zell-Klon auf Feederzellen

#### 4.2.6 Southern Blots zum Nachweis der Rekombination

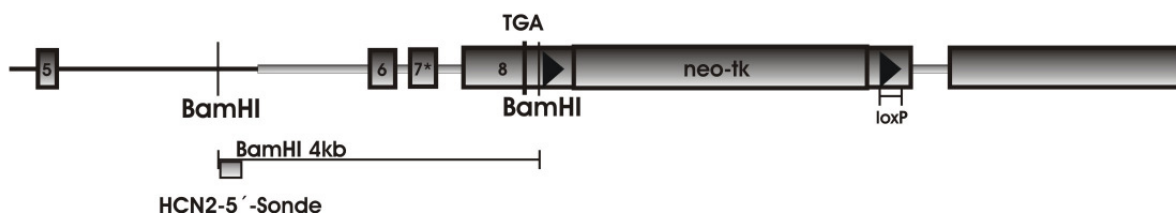
Das erste Screening des primären Targetings wurde für beide knock-in-Mutationen mit BamH I als Restriktionsenzym und der jeweiligen 5'-Sonde (Abbildung 4-22 A, 4-23 A) durchgeführt. Dabei wurden 346 ES-Zell-Klone des HCN2- und 319 Klone des HCN4-Kanals untersucht.

#### 4.2.6.1 Analyse der HCN2cad-Stammzellen mit der HCN2-5'-Sonde

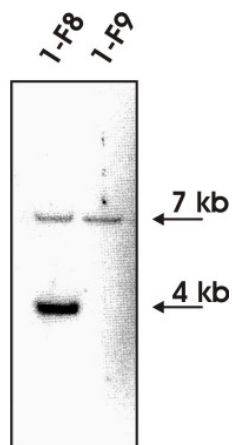
##### Wildtyp HCN2



##### Integrierter Vektor



A



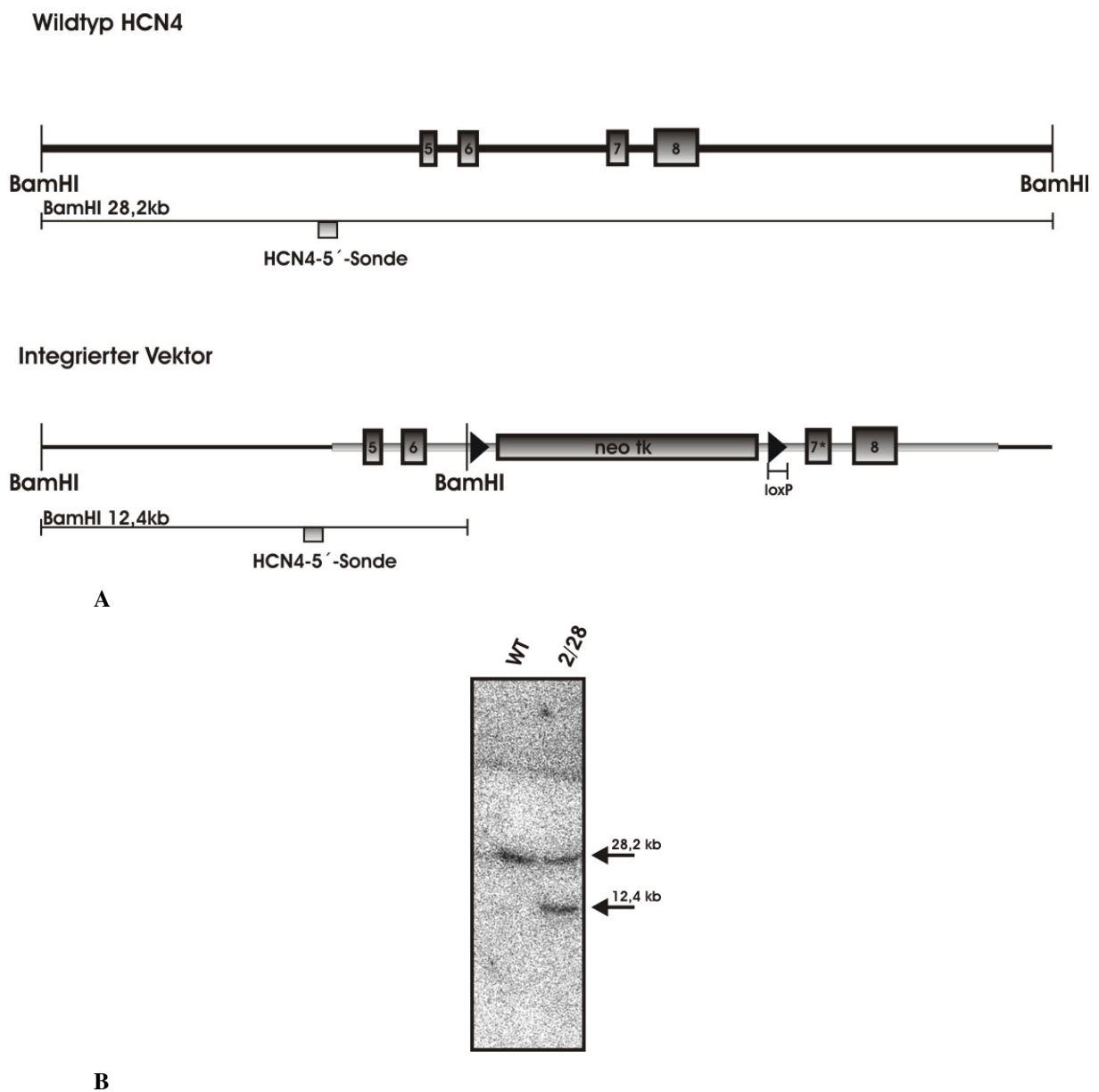
B

**Abbildung 4-22** (A) Lage der verwendeten HCN2-5'-Sonde und Größe der erwarteten Banden im Southern Blot für den HCN2cad-Kanal. (B) Southern Blot mit einem negativen und einem positiven Klon für die HCN2-5'-Sonde (BamHI).

Für die Southern Blots des primären Screenings wurden große (550 ml) Gele verwendet, auf denen in jeweils zwei Reihen 23 bzw. 26 Klone aufgetragen werden konnten. Mit zwei Gelen konnte auf diese Weise eine 96 well-Platte im Ganzen analysiert werden. Jeweils 23 bzw. 26 Klone wurden mit der Sonde hybridisiert ( $5 \times 10^6$  cpm/ml) (3.2.6.4). Die Membranen wurden einmal für 4 und einmal für 24 Stunden auf eine Phosphorimager Platte aufgelegt.

Da die homologe Rekombination nur ein Allel betrifft und somit jeder rekombinierte Klon auch ein Wildtyp Allel trägt, wurde im primären Screening eine Doppelbande von 7 kb (WT) und 4 kb (Integrand) erwartet. Auf dem beispielhaft gezeigten Blot (Abbildung 4-21) ist ein negativer Klon mit einer einzigen Bande bei 7 kb und ein positiver Klon mit der entsprechenden Doppelbande gezeigt. Diese Doppelbande wurde bei insgesamt 16 der 364 analysierten Klone gefunden.

#### 4.2.6.2 Analyse der HCN4cad-Stammzellen mit der HCN4-5'-Sonde



**Abbildung 4-23** (A) Lage der verwendeten HCN4-5'-Sonde und Größe der zu erwartenden Banden im Southern Blot (B) Southern Blot mit einem negativen und einem positiven Klon für die HCN4-5'-Sonde (BamHI).

Wie beim HCN2cad-Kanal wurden auch die ES-Zell-Klone des HCN4cad-Kanals auf ein 550 ml Gel aufgetragen. Zum Hybridisieren der Membranen wurde wiederum eine Sonde mit  $5 \times 10^6$  cpm/ml verwendet. Nach dem Auflegen der Membran auf eine Phosphorimager-Platte wurden bei richtig rekombinierten Klonen zwei Banden sichtbar (Abbildung 4-23). Bei einer Bande, mit der Größe von 28,2 kb, handelte es sich um das nicht rekombinierte Allel, also das Wildtyp-Allel. Die andere Bande, mit einer Größe von 12,4 kb, war ein auf der 5'-Seite korrekt rekombiniertes Mutations-Allel. Diese Mutationsbande wurde bei 11 von 319 untersuchten Klonen gefunden.

#### 4.2.6.3 Analyse der HCN2cad-Stammzellen mit der HCN2-3'-Sonde

Da nach der HCN2-5'-Sonde und HCN4-5'-Sonde nur eine Aussage über die richtige Integration des Targeting-Vektors sowohl für HCN2- als auch HCN4-Kanal auf der 5'-Seite getroffen werden konnte, musste auch die 3'-Integrationsseite untersucht werden. Dies geschah für beide Kanäle mit einer 3'-Sonde (HCN2-3'-Sonde und HCN4-3'-Sonde).

Hierfür wurden jeweils die positiven Klone des Screenings mit der 5'-Sonde verwendet. Die HCN2-Klone der zweiten Replikaplatte wurden mit Sca I verdaut und geblottet. Klone, die auf der 3' Seite richtig rekombiniert sind, haben neben der WT Bande bei 5 kb eine weitere bei 5,6 kb (Abbildung 4-24).

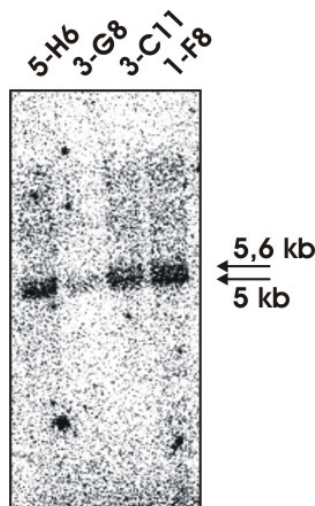
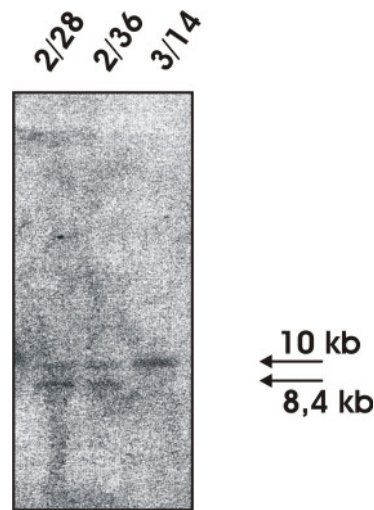


Abbildung 4-24 Southern Blot mit positiven Klonen für die HCN2-3'-Sonde (ScaI)

#### 4.2.6.4 Analyse der HCN4cad-Stammzellen mit der HCN4-3'-Sonde

Die HCN4-Stammzellen wurden für das zweite Screening lysiert und mit der Restriktionsendonuklease Hpa I verdaut. Nach dem Blotten wurden die Membranen mit der

HCN4-3'-Sonde hybridisiert. Dabei entstanden für einen positiven Klon zwei Banden. Eine Wildtypbande bei 10 kb und die Mutationsbande bei 8,4 kb (Abbildung 2-25).

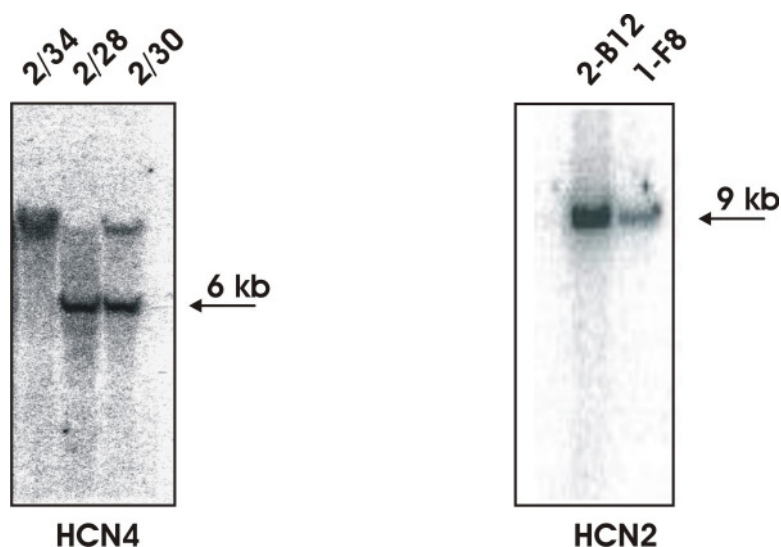


**Abbildung 2-25 Southern Blot mit zwei positiven und einem negativen Klon für den HCN4-Kanal (HpaI)**

#### **4.2.6.5 Analyse der HCN2cad- und HCN4cad-DNS mit der neo-tk-Sonde**

Der Targeting-Vektor kann auch mehrmals im Genom integrieren. Da bei mehrfacher Integration des Vektors andere Gene zerstört werden könnten, wurden die positiven Klone der 5'-Sonden und 3'-Sonden noch mit der neo-tk-Sonde hybridisiert. Dafür konnten für beide Kanäle die Membranen des BamH I-Restriktionsverdaus verwendet werden. Diese wurden mit der neo-tk-Sonde rehybridisiert. War der Targeting-Vektor nur einmal integriert, bekam man für den HCN2cad-Kanal nur eine Bande bei 9000 bp, für den HCN4cad-Kanal nur eine auf der Höhe von 6000 bp. Dies war für den HCN2cad- bei 16 Klonen und beim HCN4cad-Kanal bei 11 Klonen der Fall.





**Abbildung 4-26 neo-tk-Sonde**

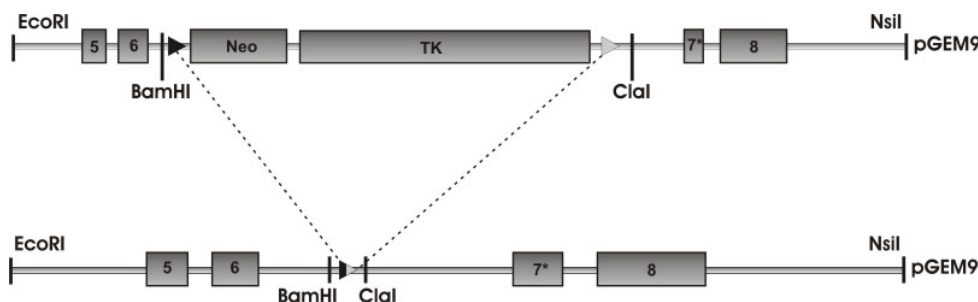
Southern Blots mit den neo-tk-Sonden für HCN2cad- (9 kb) und HCN4cad-Kanal (6 kb).

#### 4.2.6.6 Sequenzierung der integrierten Targeting-Vektoren

Nach der homologen Rekombination wurden die positiven ES-Zell-Klone durch Sequenzierung überprüft. Auf diese Weise wurden für beide Kanäle die Mutationen, sowie wichtige Übergänge, PCR-Produkte und loxP-Seiten überprüft. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass zusätzliche Mutationen durch eine fehlerhafte Integration in diesen Bereichen entstanden sind und dass die Vektoren komplett integriert waren. Die Möglichkeit, dass durch unvollständige Integration etwa die Selektionskassette aber nicht die Mutation eingefügt wurde, konnte so ebenfalls ausgeschlossen werden. Solche Klone würden genau wie die Klone mit richtiger Integration im Selektionsmedium wachsen und durch Southern-Blot Analysen alleine nicht erkennbar sein.

#### 4.2.7 Sekundäres ES-Zell-Targeting

Im sekundären ES-Zell-Targeting wurde die neo-tk-Kassette aus dem Stammzell-Genom entfernt. Dies geschieht über die beiden loxP-Seiten. Dabei werden über die Cre-Rekombinase, eine Typ-I-Topoisomerase des Bakteriophagen P1, die beiden loxP-Seiten, durch Verlust des dazwischenliegenden DNS-Fragments und einer loxP-Seite miteinander verbunden (Abbildung 4-27).



**Abbildung 4-27 Exzision der Selektionskassette**

Nach der Exzision der neo-tk-Kassette aus dem HCN4-Gen durch die transfizierte Cre-Rekombinase im sekundärem Targeting bleibt nur eine loxP-Seite und mehrere mit der Selektionskassette eingefügte Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme im Genom zurück.

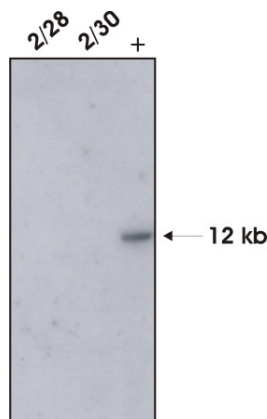
Um die Entfernung der neo-tk-Kassette über zwei verschiedene Methoden zu überprüfen, wurde nur für den HCN4-Kanal ein zweites Targeting durchgeführt. Für den HCN2-Kanal wurde die Kassette erst bei der Verpaarung der HCN2cad/neo-tk-Mäuse (HCN2cad/**neo-tk**-Kanal, da die neo-tk-Kassette im Genom noch vorhanden ist) mit Cre-Deleter Mäusen entfernt.

Für das sekundäre Targeting wurden für den HCN4-Kanal zwei Klone ausgewählt. Dafür wurden die Masterplatten mit diesen Klonen aufgetaut und diese auf 24-well Platten ausgesät. Nach Passage auf eine 6 well-Platte und danach in 25 cm<sup>2</sup> Flaschen wurden die ES-Zellen der Primärklone 2/28 und 2/30 mit dem Cre-exprimierenden Plasmid transient transfiziert (siehe 3.8.2). ES-Zellklone, bei denen durch die Rekombination die gefloxt neo-tk-Kassette entfernt worden war, überlebten, während die anderen durch die Aktivierung des Nukleosidanalogons Ganciclovir durch die Thymidinkinase der Selektionskassette abstarben. Nach sieben Tagen waren die einzelnen Klone groß genug, um isoliert zu werden. Die Klone wurden wieder einzeln auf jeweils zwei 96 well-Platten transferiert und die erste Platte als Masterplatte bei -80 °C gelagert. Die zweite Platte wurde nochmals auf drei weitere Platten gesplittet. Diese wurden bis zur Konfluenz inkubiert und anschließend lysiert (siehe 3.7.8). Die Isolation erstreckte sich für beide Klone jeweils über 5 Tage. Dabei wurden für den Klon 2/28 140, für den Klon 2/30 101 ES-Zell Klone gepickt.

#### 4.2.7.1 Southern Blot zum Nachweis der Cre-vermittelten Rekombination

Um zu überprüfen, ob die Cre-vermittelte Rekombination der ES-Zell-Klone 2/28 und 2/30 des HCN4-Kanals funktioniert hat, wurden die im zweiten Targeting isolierten Klone lysiert, mit dem Restriktionsenzym Xba I verdaut und ein Southern Blot durchgeführt. Danach

wurden die Membranen mit der neo-tk-Sonde hybridisiert. Bei erfolgreicher Rekombination sollte keine Bande bei der ES-Zell-DNS zu sehen sein. Als Positivkontrolle wurde die ES-Zell-DNS eines positiven Klon des ersten Targetings mit Xba I verdaut und mit auf das Southern-Gel aufgetragen. Wie in der Abbildung 4-28 zu erkennen ist, ließ sich nur bei der Positiv-Kontrolle mit dem Klon des ersten Targetings eine Bande mit 12 kb erkennen.

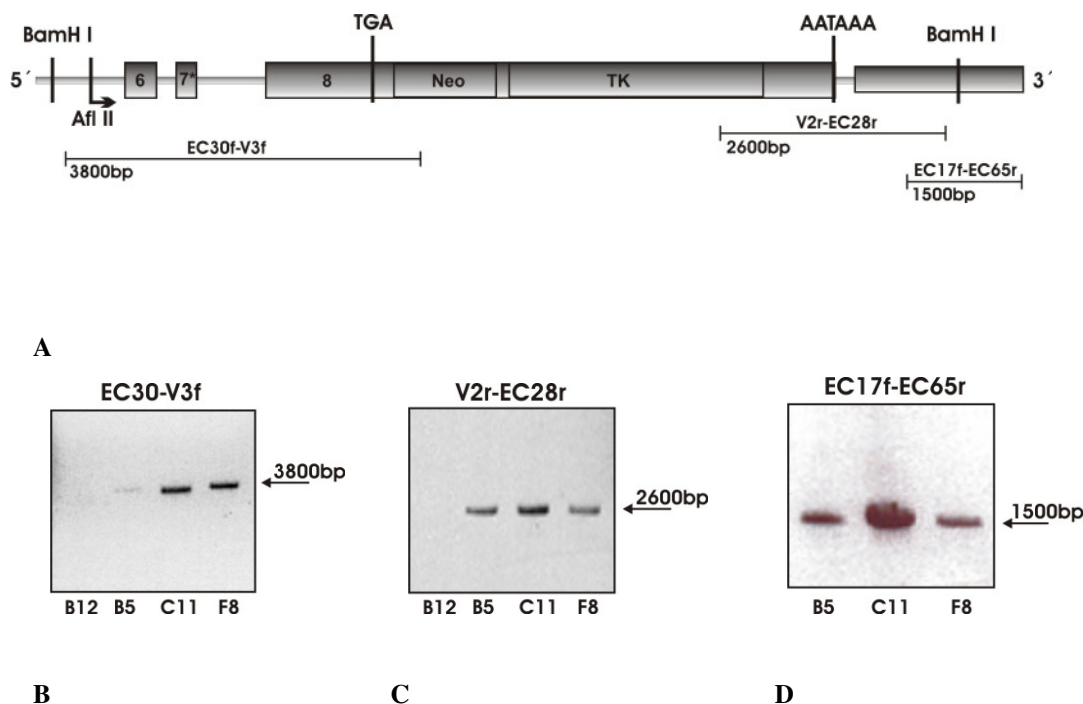


**Abbildung 4-28 Southern Blot der zwei Klone des sekundärem Targetings (2/28 und 2/30)**

Die genomische ES-Zell-DNS wurde mit Xba I verdaut und mit der neo-tk-Sonde hybridisiert. Nach erfolgreichem sek. Targeting darf keine neo-tk-Bande mehr zu sehen sein. Rechts als Kontrolle ein Klon vor dem sek. Targeting.

#### 4.2.7.2 PCR-Analyse zur Integration des Targeting-Vektors des HCN2-Kanals

Zusätzlich zu den Southern Blots wurden PCR-Analysen zur Kontrolle der richtigen Integration des Targeting-Vektors des HCN2-Kanals nach dem primären Targeting entwickelt (Abbildung 4-29 (A)). Da der Targeting-Vektor insgesamt zu lang war, um diesen komplett mit einer PCR zu überspannen, wurde diese in drei Teile unterteilt. Die erste PCR zur Überprüfung der 5'- Integrationsstelle bis in die neo-tk-Kassette, eine weitere aus der neo-tk-Kassette heraus und schließlich eine zum Test der 3'-Integrationsstelle.



**Abbildung 4-29 Überprüfung der Integration des Targeting-Vektors im HCN2 durch PCR**

(A) Wichtige Übergänge (5'-/3'-neo-tk-Integrationsstellen) des Targeting-Vektors des HCN2cad/neo-tk wurden durch PCR-Analysen überprüft. Dabei handelte es sich um (B) den 5'-Übergang des Vektors in das Wildtypgenom und der in die neo-tk-Sequenz mit den Primerpaaren EC30f bis V3f, (C) den Übergang aus der neo-tk-Kassette über die Polyadenylierungssequenz und (D) die 3' BamHI Erkennungssequenz als Grenze zwischen Targeting-Vektor und Wildtyp-Genom.

Wie in Abbildung 2-29 zu sehen ist, waren von drei untersuchten Klonen des HCN2-Kanals zwei Klone auch bei den PCR-Analysen positiv (Klon B5 und F8). Bei Klon C11 ist zu erkennen, dass die Bande bei der PCR mit den Primern EC30f bis V3f etwas kürzer ist als die der anderen beiden Klone. Dies kann daher kommen, dass durch falsche homologe Rekombination eventuell einige Basen aus dem Genom entfernt wurden. Daher wurde dieser Klon nicht mehr weiter verwendet. Der Klon B12 diente als Negativkontrolle der PCR.

#### 4.2.8 Erzeugung der transgenen HCN2cad/neo-tk- HCN4cad- Mauslinie

Da bei den HCN2cad/neo-tk-ES-Zellen kein sekundäres Targeting durchgeführt wurde, konnten diese bereits nach dem primären Targeting injiziert werden. Die ES-Zellen des HCN4cad-Kanals wurden nach dem sekundären Targeting injiziert. Die Mikroinjektion erfolgte am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried unter der Leitung von Herrn Dr. Markus Moser.

#### 4.2.8.1 Injektion positiver HCN2cad/neo-tk- und HCN4cad-Klone

Die in Tabelle 4-1 aufgeführten Klone wurden zur Injektion aufgetaut. Nach genügender Expansion wurden diese injiziert.

	Klone	
	HCN2	HCN4
	4-B5	1-F8
	2/28	2/30

**Tabelle 4-1 injizierte Klone für den HCN2cad/neo-tk- und HCN4cad-Kanal**

Da die injizierten ES-Zellen einer männlichen Sv129-Maus entstammten (Nagy, Rossant et al. 1993), ergaben sich zwei Konsequenzen. Erstens konnten nur männliche Chimären die Mutation in der Keimbahn tragen und an ihre Nachkommen weitergeben. Zweitens müssen die Nachkommen einer Verpaarung der männlichen Chimären mit schwarzen C57/Bl6 Weibchen agouti-farben (gelbbraun) sein, wenn sie die Mutation tragen. Die erhaltenen männlichen Chimären wurden im Alter von 7-8 Wochen mit C57/Bl6 Weibchen verpaart. Die aus diesen Verpaarungen hervorgegangenen agouti-farbenen Mäuse wurden genotypisiert. In der folgenden Tabelle ist die Keimbahngängigkeit bei den einzelnen Chimären zusammengefasst.

HCN2	Klon	Geschlecht	Chimärismus ( in % ES)	HCN4	Klon	Geschlecht	Chimärismus ( in % ES)
	4-B5	♂	60%		2/28	♂	100%
	4-B5	♂	80%		2/28	♂	100%
	1-F8	♂	100%		2/28	♂	100%
	1-F8	♂	100%		2/28	♂	100%
	1-F8	♂	100%		2/28	♂	100%
	1-F8	♂	100%		2/30	♂	100%
					2/30	♂	95%
					2/30	♂	95%

**Tabelle 4-2 Chimerismus der HCN2- und HCN4-Chimären in Prozent**

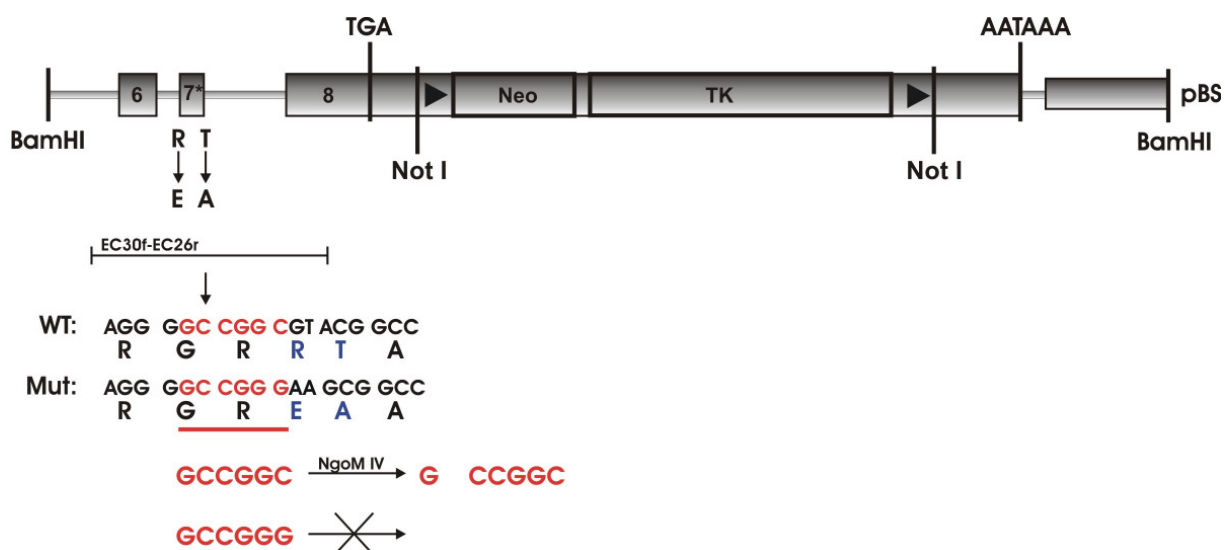
Zum jetzigen Zeitpunkt (Mai 2006) befindet sich die HCN2cad/neo-tk-Mauslinie in der ersten, heterozygoten Generation.

Die HCN4cad-ES-Zellen wurden injiziert und von Leihmüttern ausgetragen. Es wurden chimäre Nachkommen erhalten, die im Augenblick verpaart werden.

## 4.2.9 Nachweis der Mutation in der Mauslinie

### 4.2.9.1 Nachweis durch PCR-Analyse

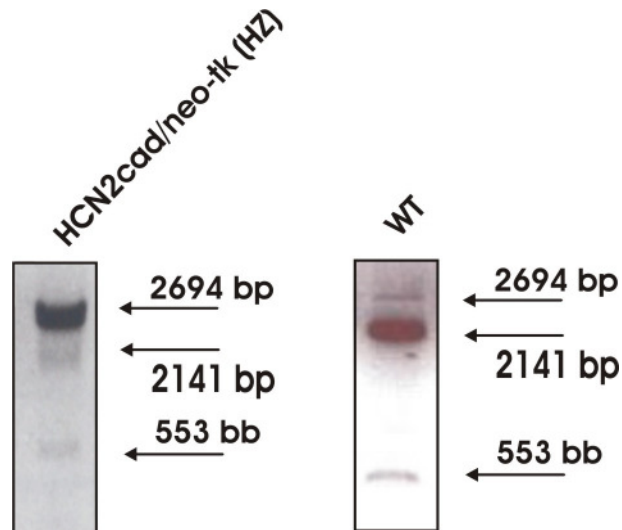
Da in Folge der Mutation der beiden Aminosäuren in der CNBD des HCN2-Kanals die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym NgoM IV zerstört wurde, konnte eine Kombination aus PCR und Restriktionsverdau entwickelt werden, um die Mutation in den Mäusen nachzuweisen (Abbildung 4-31).



**Abbildung 4-31 Schema zum NgoM IV-Test**

Da durch die Mutation der beiden Aminosäuren im knock-in-Modell des HCN2-Kanals die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym NgoM IV zerstört wurde, konnten über eine PCR und einem anschließenden Restriktionsverdau Mäuse auf diese Mutation hin untersucht werden.

Neugeborenen Tieren wurde zwischen Tag 7 und 21 eine DNS-Probe entnommen und diese zur Genotypisierung (3.2.5.2) verwendet. In der Abbildung 4-31 sind die verwendeten Primer und deren PCR-Produkte dargestellt. Abbildung 4-32 zeigt exemplarisch eine HCN2cad/neo-tk Maus und eine Wildtyp-Maus nach dem Test des PCR-Produkts der Primer EC30f und EC26r nach dem Verdau mit der Restriktionsendonuklease NgoM IV.

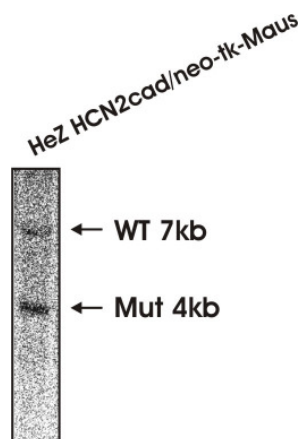


**Abbildung 4-32 NgoM IV-Restriktionsverdau**

Auf diesem Agarosegel ist je ein PCR-Fragment des NgoM IV-Tests nach dem Verdau zu sehen. Links eine positive Maus, da die Erkennungssequenz zerstört ist und die Restriktionsendonuklease nicht mehr wirksam ist, ergibt sich nur eine Bande bei 2694bp. Rechts, bei einer negativen Maus, ist die Erkennungssequenz noch vorhanden, daher ergeben sich Banden bei 2141bp und 553bp. Da die Mäuse heterozygot sind, ist auch die Wildtypbande bei 2694bp noch zu sehen.

#### 4.2.9.2 Nachweis durch Southern Blot

Neben der Analyse der heterozygoten HCN2cad/neo-tk Mäuse durch PCR wurden die Mäuse auch durch einen Southern Blot untersucht. Dazu wurden aus Gewebeproben genomische DNS gewonnen, die dann einem Restriktionsverdau mit BamH I unterzogen wurden. Diese wurden auf einem 250 ml Agarosegel aufgetrennt und nach dem Blotten mit der HCN2-5'-Sonde hybridisiert (Abbildung 4-33).

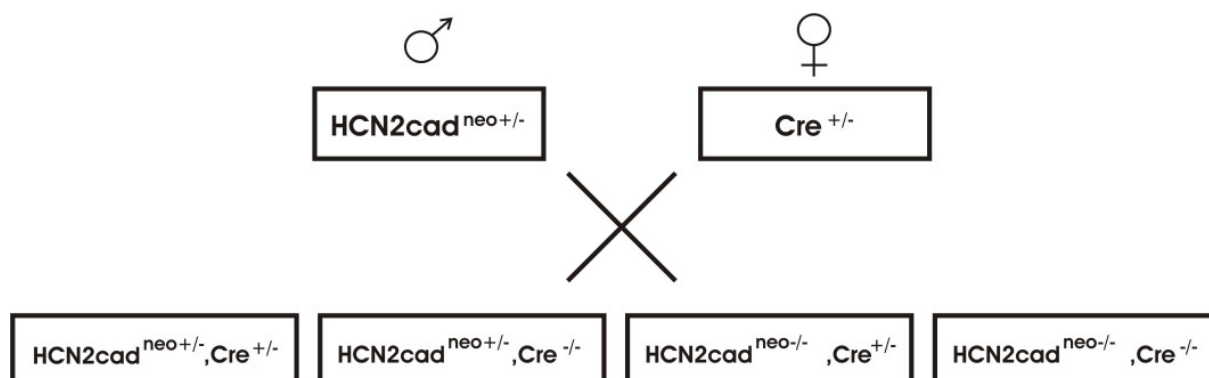


**Abbildung 4-33 Southern Blot einer heterozygoten HCN2cad/neo-tk-Maus**

Die mit BamHI verdaute genomische DNS wurde nach dem Southern Blot mit der HCN2-5'-Sonde hybridisiert. Zu erkennen ist die Wildtyp Bande bei 7 kb und die Mutations Bande bei 4 kb.

#### 4.2.10 Verpaarung heterozygoter HCN2cad/neo-tk-Mäuse mit Cre-Deleter-Mäusen

Zwei heterozygote HCN2cad/neo-tk Weibchen wurden mit einem Männchen verpaart, das in allen Geweben, die Typ-I-Topoisomerase, Cre-Rekombinase exprimiert. Dabei handelt es sich um TgN(EIIa-Cre) C5379Lmgd-Maus (The Jackson Labratory), deren Cre-Rekombinase unter dem EIIa-Adenoviruspromotor steht (Lakso et al., 1996). Die Nachkommen wurden nach einer Schwanz-Biopsie auf die Funktionalität dieser Cre hin überprüft. Der Genotyp dieser Mäuse war entweder HCN2cad/neo-tk  $-/-$ , Cre $+/-$  oder HCN2cad/neo-tk  $+/-$ , Cre $+/-$ .



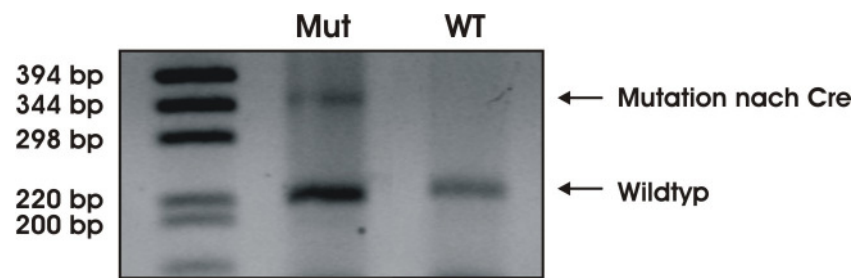
**Abbildung 4-34 Verpaarungsschema**

Heterozygote HCN2cad<sup>neo+/-</sup>-Mäuse wurden mit heterozygoten Cre-Deleter-Mäusen verpaart (Cre<sup>+/-</sup>)

#### 4.2.11 PCR-Analyse zur Funktionalität der Cre-Rekombinase in HCN2cad/neo-tk-Mäusen

Für die Analyse der Funktionalität der Cre-Rekombinase bei HCN2cad/neo-tk  $+/-$  und Cre  $+/-$ -Mäusen, wurde eine PCR-Analyse entwickelt, die zeigen konnte, ob die neo-tk-Kassette aus dem HCN2-Locus dieser Mäuse entfernt wurde. Dazu wurde mit den Primern HA7f und EC6r eine PCR über die Not I-Erkennungssequenz, die die Integrationsstelle für die neo-tk-Kassette darstellte, gemacht. War die neo-tk-Kassette noch integriert, ergab es kein Produkt, da dieses zu lang für die PCR ist (etwa 5500 bp). Lag im Bereich dieser PCR noch der Wildtyp Genloкус vor, ergab sich für das DNS-Fragment eine Länge von 234 bp. War die neo-tk-Kassette integriert und wurde sie durch die Cre-Rekombinase erfolgreich entfernt, ergab sich für das bei der PCR entstehende DNS-Fragment eine Länge von 350 bp. Diesen Längenunterschied erhielt man, da im Vergleich zum Wildtyp-Genloкус, nach Entfernen der neo-tk-Kassette bestimmte DNS-Sequenzen im Genom zurückblieben. Dabei handelt es sich z.B. um die loxP-Seite und um mehrere Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme. Abbildung 4-34 zeigt die PCR-Produkte einer heterozygoten HCN2cad-Maus und einer Wildtypmaus.





**Abbildung 4-34 PCR zur Untersuchung der Deletion der neo-tk-Kassette durch die Cre-Rekombinase**

Wird die neo-tk-Kassette durch die Verpaarung der heterozygoten HCN2cad/neo-tk Weibchen mit einem heterozygoten Cre-Deleter Männchen aus dem Genomlokus des HCN2-Kanals entfernt, entstehen zwei Banden. Eine mit 234 bp, diese entsteht durch die PCR über den Wildtyp-Genlokus der Integrationsstelle der neo-tk-Kassette im Exon 8 des HCN2-Kanals. Die andere, mit 350 bp, ergibt sich nach der Deletion der neo-tk-Kassette aus dem Genom des mutierten Allels, da etwa 120 bp im Genom verbleiben. Dabei handelt es sich um z.B. die loxP-Stelle und weitere zusätzliche Restriktions-Erkennungssequenzen.

Bei der Analyse der Nachkommen aus den Verpaarungen der heterozygoten HCN2cad/neo-tk Mäusen mit den heterozygoten Cre-Deleter-Mäusen zeigte sich, dass bei den Mäusen, die sowohl heterozygot für den HCN2cad-Kanal als auch für die Cre-Rekombinase waren, die neo-tk-Kassette nicht mehr vorhanden war (Abbildung 4-34).

## 5. Diskussion

### 5.1 Die Src-Kinase p60<sup>c-Src</sup>

Die Aktivierung und Deaktivierung von I<sub>h</sub>-Kanälen wird in vielen Zellen streng kontrolliert. Steigt die zelluläre Konzentration an cAMP, wird die Aktivierungsgeschwindigkeit der HCN-Kanäle erhöht. Eine Erniedrigung der cAMP-Konzentration hat den entgegengesetzten Effekt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung eines spezifischen Tyrosin-Restes, Tyr<sup>476</sup>, durch die Src-Kinase ein weiterer kritischer Regulator der Kanalkinetik ist. Eine Inhibition der zellulären Src-Kinase durch die pharmakologischen Blocker PP2 und Genistein oder die Kotransfektion des HCN2-Kanals mit einer inaktiven Src-Mutante verlangsamte die Aktivierungskinetik von nativen und exprimierten I<sub>h</sub>-Kanälen. Die Daten dieser Arbeit belegen, dass der dephosphorylierte Kanal signifikant langsamer aktiviert als der phosphorylierte. Der Phosphorylierungs- /Dephosphorylierungs-Grad ist somit eine wichtige Determinante der Kanal-Kinetik.

Weiterhin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Src-Kinase mit ihrer SH3-Domäne an den HCN2-Kanal bindet. Als minimaler Bereich für die hochaffine Bindung der Src-Kinase konnte eine Sequenz identifiziert werden, die sich von der C'-Helix des C-Linkers bis zum C-Terminus der CNBD erstreckt. Die Ziel-Sequenz der Src-Kinase konnte nicht genauer eingengt werden, eventuell weil sich die Reste, die eine direkte Interaktion mit der SH3-Domäne eingehen, sowohl über den C-Linker als auch die CNBD erstrecken. Es ist anzunehmen, dass nur bei korrekter Faltung des C-Linkers/CNBD sich die für die Bindung mit der SH3-Domäne wichtigen Reste in einer günstigen räumlichen Konformation befinden, was für eine Interaktion essentiell ist. Da diese Region bei allen HCN-Isoformen (HCN1-4) konserviert ist, kann angenommen werden, dass die Bindung der Src-Kinase eine allgemeine Eigenschaft dieser Kanäle ist. Diese Befunde stehen im Einklang mit Daten aus der Literatur (Santoro et al., 1997). Die Autoren wiesen eine Bindung der SH3-Domäne der n-Src-Kinase, einer neuronalen Form der Src-Kinase, an den C-Terminus des HCN1-Kanals nach. Die n-Src-Kinase ist eng mit der c-Src-Kinase verwandt und unterscheidet sich von der c-Src-Kinase durch eine Insertion von 6 bzw. 11 Aminosäuren (Roskoski, 2004). Die strukturellen Gegebenheiten der Src-Isoform-spezifischen Bindung an den HCN1-Kanal werden zukünftige Experimente zeigen.

Die SH3-Bindung an den HCN2-Kanal ist ein weiteres Beispiel für eine Interaktion über eine nicht-klassische Bindungssequenz. Die identifizierte Sequenz enthält kein für die SH3-Bindung normalerweise wichtiges, Prolin-reiches Motiv (PXXP) (Feng et al., 1994). Jedoch

gibt es Studien, die zeigen, dass die SH3-Domäne auch an nicht-PXXP-Sequenzen binden kann (Kaneko et al., 2003; Kang et al., 2000; Mongiovi et al., 1999).

Sowohl durch Analysen von Punktmutanten als auch von Mutationskombinationen mit einer Umwandlung von bis zu neun der 16 intrazellulären Tyrosinen in Phenylalanine konnte ein einziger Tyrosinrest (Tyr476 im HCN2) identifiziert werden, der Ziel der Phosphorylierung durch die Src-Kinase ist. Durch die Mutation dieses Restes zu Phenylalanin war die Aktivierung nicht mehr sensitiv gegenüber Src-Inhibitoren. Jedoch kann der Verlust der Src-Regulation bei der HCN2-Y476F-Mutante durch einen unspezifischen sterischen Effekt nicht ausgeschlossen werden. Die Mutation der übrigen 16 intrazellulären Tyrosin-Reste in Phenylalanin hatten keinen Effekt auf die Regulation durch die Src-Kinase. Ebenso konnte durch eine Mutation im analogen Tyrosin des HCN4-Kanals (Y554F) die Sensitivität von Src-Inhibitoren eliminiert werden.

Auch in der A Untereinheit von CNG-Kanälen der Seh-Stäbchen (CNGA1) konnte eine Phosphorylierung von Tyrosinresten gezeigt werden (Tyr<sup>498</sup>) (Molokanova et al., 1999). Kommt es zu einer Phosphorylierung dieses Tyrosins, welches sich im  $\beta$ 1-Strang der CNBD befindet, hat das eine Abnahme der cGMP-Affinität der Kanäle zur Folge. Interessanterweise befindet sich die korrespondierende Aminosäure im HCN2-Kanal (Phe<sup>538</sup>) in unmittelbarer Nähe zum Tyr<sup>476</sup> (mit einem Abstand weniger als 10 Å). Molekular wurde die Kinase, die den CNG-Kanal reguliert, noch nicht identifiziert. Bedenkt man jedoch die hohe Ähnlichkeit zwischen der C-Linker-CNBD-Region der HCN- und CNG-Kanäle, ist eine Bindung der Protein-Tyrosin-Kinase an den CNG-Kanal über eine SH3-Domäne relativ wahrscheinlich.

Als nächstes wurde der Frage nachgegangen, wie durch die Phosphorylierung des Tyr<sup>476</sup>, das in der B'-Helix des C-Linkers lokalisiert ist, die Kinetik der HCN-Kanäle reguliert werden könnte.

Experimente haben gezeigt, dass der C-Linker sowohl bei HCN- als auch bei CNG-Kanälen die Kopplung der Zyklonukleotidbindung mit dem Kanal-„Gating“ kontrolliert. Bei Betrachtung der Kristallstruktur des HCN2-C-Terminus wird deutlich, dass die Hydroxylgruppe des Tyr<sup>476</sup> eine Wasserstoffbrücke zum Carbonyl-Rückgrat des Glu<sup>494</sup> aus der C'-Helix der benachbarten Untereinheit des Kanal-Tetramers ausbildet. Daraus könnte man schließen, dass durch das Übertragen eines Phosphatrestes durch die Src-Kinase oder Entfernen der Hydroxylgruppe (Y476F) des Tyr476 eine Schwächung dieser Bindung und somit eine Destabilisierung der Untereinheiten eintreten könnte. Geht man von solch einem

Modell aus, würden die so phosphorylierten Kanäle schneller aktivieren, da ihre Untereinheiten miteinander weniger stark interagieren als bei dephosphorylierten C-Linkern der Kanäle.

## **5.2 Vektorkonstruktion und Targeting für die HCN2cad- und HCN4cad-Mauslinien**

Das Ziel im weiteren Verlauf dieser Arbeit war die Untersuchung der physiologischen Relevanz der cAMP-abhängigen Regulation von HCN2- und HCN4-Kanälen. Hierfür sollten zwei transgene Mauslinien generiert werden, deren HCN2- oder HCN4-Kanäle insensitive gegenüber Zyklonukleotiden sind. Zwei für die Bindung von cAMP essentielle Aminosäuren in der Zyklonukleotidbindungsdomäne (CNBD) (Arginin und Threonin) der Kanäle wurden mutiert. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass beim HCN4-Kanal diese Mutationen (R669 und T670 in der CNBD in R669E und T670A) die Sensitivität gegenüber cAMP eliminierten, ohne Einfluss auf die Kinetik, Spannungsabhängigkeit der Aktivierung oder Expressionsrate zu haben. Targeting-Vektoren für den HCN2- und HCN4-Kanal, die diese Mutationen trugen, sollten in Maus-ES-Zellen eingebracht werden. Durch homologe Rekombination in den ES-Zellen kann diese Mutation als knock-in ins Genom der Maus integriert werden.

Da für den HCN4-Kanal bereits die genomische DNS vorlag, musste im Rahmen dieser Arbeit nur für den HCN2-Kanal eine Maus-Genom Bibliothek gescreent werden, um so die genomische DNS für diesen Kanal zu erhalten. Nach der Analyse der Membranen des Mausgenoms konnten vier pPAC4-Klone identifiziert werden, die für die HCN2-Sonde (Sonde-EC1) ein positives Signal ergaben. Für diese Klone war jedoch weder das 5'- noch das 3'- Ende bekannt. Daher wurden sie zuerst durch PCR-Analysen auf die für einen Targeting-Vektor benötigten DNS-Sequenzen hin untersucht. Drei der vier analysierten Klone hatten den für den Targeting-Vektor benötigten DNS-Bereich als Insert. Aus einem dieser Klone (391-G13) wurde durch Restriktionsverdau ein 7000bp DNS-Fragment in einen pBluescript-Vektor subkloniert, um daraus den Targeting-Vektor zu erstellen. Das 5'-Ende dieses DNS Fragments lag im Intron zwischen Exon 5 und Exon 6, das 3'-Ende lag in einem weiteren Gen 3' vom Exon 8 des HCN2-Kanals (RIKEN 1110018N15). Obwohl das DNS-Fragment, das im nächsten Gen 3' nach dem HCN2-Kanal liegt, Teil des homologen Arms des Targeting-Vektors ist, ergibt sich für die Funktionalität dieses Gens bei korrekter homologer Rekombination keine Einschränkung. Durch eine PCR konnte gezeigt werden, dass es keinen Längenunterschied zwischen dem rekombinierten Genfragment und dem des

Wildtypgenfragments gab. Dies lässt darauf schließen, dass dieses Gen durch die Rekombination nicht zerstört wurde.

Für den HCN2-Kanal wurden 364 Klone im primären Targeting isoliert, von denen 16 bei allen drei Sonden positiv waren. Dies entsprach 4,3 % aller isolierten ES-Zell-Klone für den HCN2-Kanal. Beim HCN4-Kanal lag die Quote für positive Klone im ersten Targeting bei 3,4 %. Dies waren 11 positive von 319 isolierten Klonen.

Zusätzlich wurden für den HCN2-Kanal noch PCR-Analysen der homologen Rekombination durchgeführt. Da es aufgrund der Länge des entstehenden PCR-Produktes nicht möglich war, den ganzen Targeting-Vektor zu überspannen, wurde dieser in drei Teile unterteilt. Dabei handelte es sich um Bereiche der 5'- und 3'-Integrationsenden des Targeting-Vektors und die loxP-Seiten der Selektionskassette. Hätte es Fehler bei der Integration der Enden des Targeting-Vektors gegeben, wären Längenunterschiede bei den PCRs zwischen Wildtyp- und mutiertem Allel, also Doppelbanden, zu sehen gewesen. Die positiven Ergebnisse der für die Blastozysteninjektion verwendeten Klone waren ein weiterer Hinweis auf ein richtiges Rekombinationsereignis.

Um die korrekte Funktion dieser Kanäle nach erfolgter homologer Rekombination zu gewährleisten, mussten die geflochten Selektionskassetten aus dem Genom entfernt werden. Dies geschah über zwei verschiedene Wege. Für den HCN4-Kanal wurde ein sekundäres Targeting durchgeführt, wodurch die injizierten ES-Zellen bereits ohne neo-tk-Kassette waren. Von den HCN4-Klonen, die positiv waren, wurden zwei Primärklone für das sekundäre Targeting ausgewählt (2/28 und 2/30). Diese wurden im primären Targeting an verschiedenen Tagen isoliert, um auszuschließen, dass durch eventuelle Probleme an einem Tag beide ES-Zell-Klone ihre Omnipotenz verloren haben. Somit wäre auf jeden Fall einer der beiden Klone keimbahngängig geblieben. Die beiden Klone wurden mit der Cre-Rekombinase transfiziert. Da die Cre-Rekombinase sehr effizient arbeitet, mussten für das sekundäre Targeting weniger Klone isoliert und gescreent werden, nämlich insgesamt 140 ES-Zell-Klone für den Klon 2/30 und 101 für den Klon 2/28. Bei allen diesen isolierten ES-Zellen war die Selektionskassette korrekt entfernt.

### **5.2.1 Entfernung der neo-tk-Kassette im HCN2cad/neo-tk-Mäusen durch Verpaarung mit Cre-Deleter-Mäusen**

Die HCN2cad-ES-Zell-Klone 1-F8 und 4-B5 wurden nach dem ersten Targeting sofort in Blastozysten injiziert und von Leihmüttern ausgetragen. Im Gegensatz zu den injizierten HCN4cad-ES-Klonen war die neo-tk-Kassette daher noch im Genom vorhanden. Da die neo-

tk-Kassette in der 3'-Region nach dem Stop-Codon im Exon 8, aber noch vor der Polyadenylierungssequenz liegt, ist das entstehende Transkript des HCN2cad-Gens um etwa 5000 bp länger als die des Wildtyp-HCN2-Kanals. Die korrekte Transkription oder Translation der HCN2cad-mRNA ist damit nicht mehr gewährleistet; ebenso könnte es zu einem Abbau der mRNA kommen. Da die neo-tk-Selektionskassette von loxP-Seiten flankiert ist, kann sie durch die Cre-Rekombinase aus dem Genom entfernt werden. Um dies zu erreichen wurden die für den HCN2cad-Kanal heterozygoten Mäuse der F1-Generation zur in vivo Deletion der neo-tk-Kassette mit Cre-Deleter Mäusen (Jackson-Laboratories) verpaart. Diese Cre-Deleter-Mäuse exprimieren die Cre-Rekombinase, die unter dem EIIa-Adenoviruspromotor steht ubiquitär in allen Geweben. Damit die HCN2cad-Mäuse den mutierten Kanal ohne Selektionskassette an ihre Nachkommen vererben, ist es essentiell, dass die Cre-Rekombinase in den Keimzellen exprimiert wird. Auf diesem Weg entstehen Mäuse, die HCN2cad-Kanäle ohne Selektionskassette exprimieren, wodurch eine in-vitro-Deletion durch ein sekundäres ES-Zell-Targeting nicht mehr nötig ist.

Die aus der Verpaarung der heterozygoten HCN2cad-Mäuse mit heterozygoten Cre-Deleter-Mäusen erhaltenen Nachkommen wurden mittels PCR-Analysen auf die Exzision der neo-tk-Kassette hin untersucht. Bei allen untersuchten Mäusen, die sowohl das Cre-Rekombinase-Gen, als auch den HCN2cad-Kanal heterozygot exprimierten, konnte eine Entfernung der Selektionskassette festgestellt werden. Da jedoch die untersuchte DNS mittels Schwanzbiopsie erhalten wurde, konnte noch nicht überprüft werden, ob auch in den Keimzellen diese Exzision erfolgte.

### 5.2.2 Ausblick

#### **HCN2cad-Kanal:**

Im Anschluss an diese Arbeit soll untersucht werden, ob die HCN2cad-Mäuse ebenso wie die HCN2-KO-Tiere ein pathologisch verändertes EEG aufweisen und unter Absenzen leiden. Auch der Einfluss der cAMP-Modulation auf das Verhalten von thalamischen Neuronen soll analysiert werden. Weiterhin kann im Herzen überprüft werden, welche Veränderung der Regulation im Vergleich zu Wildtyp- und HCN2-KO-Tieren bestehen.

#### **HCN4cad-Kanal:**

Die HCN4-KO-Mäuse sterben bereits in utero, da diese keine kardialen Schrittmacherzellen bilden können (Stieber et al., 2003). An Hand der HCN4cad-Tiere kann nun geklärt werden,

ob die Modulation des HCN4-Kanals durch Zyklonukleotide für die Ausbildung dieser Schrittmacherzellen benötigt wird. Es können Untersuchungen zur sympathischen und parasympathischen Regulation der Herzfrequenz durchgeführt werden. Die Untersuchungen werden zeigen, wie groß der Anteil des Kanals an der autonomen Regulation des Herzens ist. Die Funktion des HCN4-Kanals im Gehirn konnte aufgrund der Letalität der KO-Mäuse noch nicht untersucht werden. Daher soll mit Hilfe der HCN4<sup>cad</sup>-Mäuse die Funktion des Kanals im Gehirn analysiert werden.

## 6. Zusammenfassung

### 6.1 Regulation von HCN2- und HCN4-Kanälen durch Src-Kinase

Ein Reihe von Ionenkanälen, wie zum Beispiel CNG-Kanäle, bilden stabile Komplex mit Tyrosinkinasen und Phosphatasen und werden in vivo durch Tyrosinphosphorylierung reguliert. Es gibt bisher keine Untersuchungen hinsichtlich einer Regulation von Schrittmacherkanälen durch Tyrosinkinasen.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde daher die Regulation von HCN2- und HCN4-Kanälen durch die Src-Kinase untersucht. Mit Hilfe der patch clamp Methode konnte nachgewiesen werden, dass eine Inhibition der Src-Kinase zu einer verlangsamten Aktivierung des HCN2-Kanals führt. Anschließend wurde biochemisch untersucht, ob der HCN2-Kanal Interaktionspartner und Substrat der Src-Kinase ist. Dazu wurden zunächst Ko-IP-Experimente an heterolog in HEK Zellen exprimierten HCN2-Kanälen durchgeführt. Diese Untersuchungen bestätigten, dass der HCN2-Kanal tatsächlich die Src-Kinase bindet und durch diese phosphoryliert wird. Dieser Befund konnte anhand weiterer Ko-IP-Experimente für das Großhirn der Maus verifiziert werden. Um die Interaktionsstelle zwischen Src-Kinase und HCN2-Kanal systematisch einzuengen, wurde ein Two-Hybrid-Screen in Hefezellen durchgeführt. Dieser ergab, dass die Src-Kinase über ihre SH3-Domäne mit einem Bereich im C-Terminus des HCN2-Kanals interagiert, der sich von der C'-Helix bis zum C-terminalen Ende der CNBD erstreckte. Das Ergebnis des Screens konnte mit GST-Pulldown-Assays bestätigt werden. Um die Phosphorylierungsstelle des HCN2-Kanals zu ermitteln, wurden zunächst Cluster von zytoplasmatischen Tyrosinresten zu Phenylalanin mutiert. Durch Austausch einzelner Tyrosinreste innerhalb dieser Cluster konnte Y476 als Phosphorylierungsstelle identifiziert werden. Analog dazu scheint der HCN4-Kanal am homologen Tyrosinrest Y554 durch die Src-Kinase phosphoryliert zu werden. Der Effekt von Src-Kinase-Inhibitoren war bei Mutationen an diesen homologen Tyrosinen fast vollständig erloschen. Um zu bestätigen, dass die Regulation von HCN-Kanälen durch die Src-Kinase physiologisch relevant ist, wurde der Einfluss der Kinase auf  $I_h$  in verschiedenen Nativzellen untersucht. Eine Blockade der Src-Kinase führte in Schrittmacherzellen aus dem Sinusknoten, in atrialen Kardiomyzyten (HL-1 Zelllinie) und in Spinalganglienzellen der Maus zur gleichen Verlangsamung der Kanalaktivierung wie bei exprimierten HCN-Kanälen. Diese Ergebnisse bestätigen die Befunde der elektrophysiologischen und biochemischen Versuche und unterstreichen die physiologische Relevanz dieses molekularen Mechanismus.



## 6.2 Herstellung von Mauslinien mit cAMP-insensitiven HCN2- und HCN4-Kanälen

Im zweiten Teil der Arbeit wurden durch einen knock-in-Ansatz zwei Mauslinien erstellt, bei denen der HCN2- bzw. HCN4-Kanal durch gezielte Mutation insensitive gegenüber cAMP ist. In solchen Mauslinien ist der HCN2- und HCN4-Kanal rein spannungsabhängig reguliert. Die Strategie bestand darin, für die cAMP/cGMP Bindung wichtige Aminosäuren auszuschalten, die fehlende cAMP-Wirkung *in vitro* zu testen und anschließend entsprechende Mausmutanten herzustellen. Literaturbekannte Arbeiten über zyklonukleotid-gesteuerte (CNG-) Kanäle zeigen, dass zwei spezifische Arginin- und Threoninreste (HCN2: R591 und T592/HCN4: R669 und T670) im siebten Faltblatt der Zyklonukleotid-Bindungsstelle (CNBD) essentiell für die cAMP/cGMP Bindung sind. Für den *in vitro* Ansatz wurden in HCN2- und HCN4-Kanälen diese Arginin- und Threoninreste durch Glutamat und Alanin ersetzt. Nach Expression in HEK-Zellen waren beide Mutanten vollkommen insensitive gegenüber cAMP. Dagegen waren in Abwesenheit von cAMP die basalen elektrophysiologischen Parameter wie Stromdichte, Spannungsabhängigkeit und Kinetik bei den Kanalmutanten gegenüber dem Wildtyp unverändert. Die entsprechenden Mutationen wurden nun durch Gentergating ins Mausgenom eingebracht. Dazu wurden aus einer genomischen 129SvJ-Bibliothek pPAC Klone isoliert, die das Ziel-Exon 7 mit den für die cAMP Bindung essentiellen Aminosäuren und ca. 3 kb der angrenzenden 5'- und 3'-Bereiche enthielten. Ausgehend von diesen Klonen erfolgte die Konstruktion der beiden Targeting-Vektoren mit den gewünschten Mutationen im Exon 7 des HCN2- bzw. HCN4-Kanals (HCN2cad bzw. HCN4cad). Um nach dem primären und sekundärem Targeting eine Selektion von Klonen zu ermöglichen, wurde zusätzlich eine neo-tk-Kassette mit den flankierenden loxP-sites in die Targeting-Vektoren integriert. Für den HCN2cad-Targeting-Vektor wurde die Kassette in das 3' Ende zwischen Stop-Codon und Polyadenylierungssignal kloniert, für den HCN4cad-Targeting-Vektor in das Intron zwischen Exon 6 und 7. Die so konstruierten Vektoren wurden in R1 ES-Zellen elektroporiert. Anschließend wurden G418-resistente Klone mit Southern-Blots auf eine korrekte Integration gescreent. In einem zweiten Targeting wurden zwei positive HCN4cad-ES-Zell-Klone mit dem Expressionsplasmid für die Cre-Rekombinase elektroporiert, um die neo-tk-Kassette zu deletieren. Die so modifizierten Stammzellen wurden in Blastozysten injiziert und von Leihmüttern ausgetragen. Es wurden chimäre Nachkommen erhalten, die im Augenblick verpaart werden. Zur Erstellung der HCN2cad-Maus wurden bereits nach dem primären Targeting zwei positive Klone in Blastozysten injiziert und von Leihmüttern ausgetragen. Mäuse der F1-Generation wurden zur *in vivo* Deletion der neo-tk-Kassette mit der Cre-Deleter Maus

verpaart. Auf diese Weise konnten heterozygote HCN2cad-Mäuse mit deletierter neo-tk Kassetten gezüchtet werden.

## 7. Anhang

### 7.1 Verwendete Primer

#### HCN2-Kanal:

<b>Primer zur Gewinnung der Sonden für den HCN2-Kanal</b>
---

HCN2-5'-Sonde\_for AAACCCTGGTCCTCATGGCT

HCN2-5'-Sonde\_rev TATGATGGCTAGCATGCCTGG

HCN2-3'-Sonde\_for TTGAAAGCATATGAGGGAGGTG

HCN2-3'-Sonde\_rev CAACCTGACTGGCCTCAAGAA

neotk\_for AAGCTTGATATCGAGGGCCC

neotk\_for GGCGCCTACCGGGGATGT

<b>Primer zum Einfügen der RT→ EA Mutation im Targeting-Vektor des HCN2-Kanals</b>
--

EC20f	CACATATCCAGTGTTTTGCCTG	RT-Mutation im HCN2
EC2r	TGCACCATCTCACGGTCATATT	RT-Mutation im HCN2
EC15f	GCCGGGAAGCGGCCAGCGTGCGAGCT	Mutationsprimer RT im HCN2
EC16r	TGGCCGCTTCCTCGGCCCTCGTGA	Mutationsprimer RT im HCN2

<b>Sequenzier-Primer für den Targeting-Vektor des HCN2-Kanals (genomische DNS)</b>
--

EC3f	AAGATGTTTGATGAGGACAGCA	im Exon 5
EC19f	TCCCCACCTCTTAAGATTTC	Intron zwischen Exon 5 und 6
EC30f	TAAGACAGGGTCTCTTTTGGC	Intron zwischen Exon 5 und 6
EC20f	CACATATCCAGTGTTTTGCCTG	Intron zwischen Exon 5 und 6
EC21f	TTATGAGACAGGAGCTCATGCA	Intron zwischen Exon 5 und 6
EC1f	TGACAAAGCTCAAATTTGAGGTC	im Exon 6
EC2r	TGCACCATCTCACGGTCATATT	im Exon 8
EC5f	ACAAGGTTTCAGCATGATCTCAG	im Exon 8

EC27r	CTTGATCCATATTCTTCCTCGG	3' des Exon 8
HA7f	GCCATAGAGGGACGTAGGT	über neotk- Integrationsstelle
EC6r	TGATGTCTACCCTAACCTGTTT	RIKEN 1110018N15
EC28r	TAGCCTTTCTACAAGTGATGGG	RIKEN 1110018N15
EC17f	AACTGGCAGGTGGGAAATGTA	RIKEN 1110018N15

<b>Primer zur Herstellung der HCN2-Tyrosin-Mutanten</b>
---

BM127	AGAGCATGACAGACATCT	5' der BspI- Schnittstelle
EC14r	AAGTTGGAAGAGAGGCGCGA	3' der BspEI- Schnittstelle
EC58f	GAT <b>TTCT</b> TATGAACACCGGTACCAAGG	Y476F
EC59r	CCTTGGTACCGGTGTTTCATAG <b>AAATC</b>	Y476F
EC49f	GAAGATCCACGATTACT <b>TTT</b> GAACAC	Y477F
EC50r	GTGTTC <b>AAAG</b> TAATCGTGGATCTTC	Y477F
EC60f	GAACACCGGT <b>TTCC</b> AAGGGGAAGAT	Y481F
EC61r	ATCTTCCCCTTG <b>GAAC</b> CGGTGTTC	Y481F

#### HCN4-Kanal:

<b>Primer zur Gewinnung der Sonden für den HCN4-Kanal</b>
---

HCN4-5'-Sonde\_for TAGATGCCAGCAAGAAGGGC

HCN4-5'-Sonde\_rev ACCACAGTACTGACAGTTGT

HCN4-3'-Sonde\_for AATTCTTGTTTAAACACAGT

HCN4-3'-Sonde\_rev AGTTTGTGCTCATTAACACAA

<b>Primer zum Einfügen der RT→ EA Mutation im Targeting-Vektor des HCN4</b>
---

RM42F	GGGTCGG <b>GAAG</b> CGGCCAGCGTCAGA
RM43R	TCTGACGCTGGCCG <b>TTCC</b> CGACCC
RM45F	AGAGAGAGAAACAACACTAGACAA
RM46R	GCACAGTGGGCCATCTCACGG

<b>Primer zum Einfügen der RT→ EA Mutation in der cDNS des HCN4-Kanals</b>
--

EC10f	GAAGAGATCTTCCACATGACC	5´ der KpnI-Schnittstelle
EC8r	AGACGCGGAGATGAGCTTGA	3´ der BssHII-Schnittstelle
EC7f	CCGGGAAGCAGCCAGCGTGA	Mutationsprimer
EC9r	TGGCTGCTTCCCGGCCCG	Mutationsprimer

## 7.2 Antikörper

### 7.2.1 Primäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Konzentration	Herkunft
anti-HCN2	Kaninchen	1:2000 (WB-AK) 1:100 (Ko-IP/IP)	Alomone
anti-pY (4G10)	Maus	1:2000 (WB-AK) 1:100 (IP)	Upstate Biotechnology Inc.
anti-CNGB3	Kaninchen	1:100 (Ko-IP)	Gerstner et al. unveröffentlichte Daten
anti-GST	Maus	1:2000 (WB-AK)	Amersham Biosciences
anti-p-Tyr-100	Maus	1:2000 (WB-AK) 1:100 (IP)	Upstate Biotechnology Inc.
anti -Src (GD11)	Maus	1:2500 (WB-AK) 1:100 (Ko-IP)	Upstate Biotechnology Inc.
anti-Myc (9B11)	Maus	1:2000 (WB-AK)	Cell Signalling Tech.

### 7.2.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Konjugat	Konzentration	Herkunft	Antikörper
anit-mouse	Esel	HRP	1:2500	Amersham Pharmacia	anit-mouse
anti-rabbit	Esel	HRP	1:2500	Amersham Pharmacia	anti-rabbit



## 8. Literaturverzeichnis

- Altenhofen, W., J. Ludwig, E. Eismann, W. Kraus, W. Bonigk, and U.B. Kaupp. 1991. Control of ligand specificity in cyclic nucleotide-gated channels from rod photoreceptors and olfactory epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88:9868-72.
- Biel, M., A. Schneider, and C. Wahl. 2002. Cardiac HCN channels: structure, function, and modulation. *Trends Cardiovasc Med*. 12:206-12.
- Chen, S., J. Wang, and S.A. Siegelbaum. 2001. Properties of hyperpolarization-activated pacemaker current defined by coassembly of HCN1 and HCN2 subunits and basal modulation by cyclic nucleotide. *J Gen Physiol*. 117:491-504.
- DiFrancesco, D., and M. Mangoni. 1994. Modulation of single hyperpolarization-activated channels (i(f)) by cAMP in the rabbit sino-atrial node. *J Physiol*. 474:473-82.
- DiFrancesco, D., and P. Tortora. 1991. Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature*. 351:145-7.
- Doyle, D.A., J. Morais Cabral, R.A. Pfuetzner, A. Kuo, J.M. Gulbis, S.L. Cohen, B.T. Chait, and R. MacKinnon. 1998. The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science*. 280:69-77.
- Felgner, P.L., T.R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H.W. Chan, M. Wenz, J.P. Northrop, G.M. Ringold, and M. Danielsen. 1987. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 84:7413-7.
- Feng, S., J.K. Chen, H. Yu, J.A. Simon, and S.L. Schreiber. 1994. Two binding orientations for peptides to the Src SH3 domain: development of a general model for SH3-ligand interactions. *Science*. 266:1241-7.
- Gauss, R., R. Seifert, and U.B. Kaupp. 1998. Molecular identification of a hyperpolarization-activated channel in sea urchin sperm. *Nature*. 393:583-7.
- Hughes, A.L. 1996. Evolution of the src-related protein tyrosine kinases. *J Mol Evol*. 42:247-56.
- Ishii, T.M., M. Takano, L.H. Xie, A. Noma, and H. Ohmori. 1999. Molecular characterization of the hyperpolarization-activated cation channel in rabbit heart sinoatrial node. *J Biol Chem*. 274:12835-9.
- Jiang, X., G.C. Bett, X. Li, V.E. Bondarenko, and R.L. Rasmusson. 2003a. C-type inactivation involves a significant decrease in the intracellular aqueous pore volume of Kv1.4 K<sup>+</sup> channels expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol*. 549:683-95.
- Jiang, Y., A. Lee, J. Chen, V. Ruta, M. Cadene, B.T. Chait, and R. MacKinnon. 2003b. X-ray structure of a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel. *Nature*. 423:33-41.
- Kaneko, T., T. Kumasaka, T. Ganbe, T. Sato, K. Miyazawa, N. Kitamura, and N. Tanaka. 2003. Structural insight into modest binding of a non-PXXP ligand to the signal transducing adaptor molecule-2 Src homology 3 domain. *J Biol Chem*. 278:48162-8.
- Kang, H., C. Freund, J.S. Duke-Cohan, A. Musacchio, G. Wagner, and C.E. Rudd. 2000. SH3 domain recognition of a proline-independent tyrosine-based RKxxYxxY motif in immune cell adaptor SKAP55. *Embo J*. 19:2889-99.
- Kaupp, U.B., and R. Seifert. 2002. Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiol Rev*. 82:769-824.
- Lakso, M., J.G. Pichel, J.R. Gorman, B. Sauer, Y. Okamoto, E. Lee, F.W. Alt, and H. Westphal. 1996. Efficient in vivo manipulation of mouse genomic sequences at the zygote stage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:5860-5.
- Ludwig, A., T. Budde, J. Stieber, S. Moosmang, C. Wahl, K. Holthoff, A. Langebartels, C. Wotjak, T. Munsch, X. Zong, S. Feil, R. Feil, M. Lancel, K.R. Chien, A. Konnerth, H.C. Pape, M. Biel, and F. Hofmann. 2003. Absence epilepsy and sinus dysrhythmia in mice lacking the pacemaker channel HCN2. *Embo J*. 22:216-24.

- Ludwig, A., X. Zong, F. Hofmann, and M. Biel. 1999. Structure and function of cardiac pacemaker channels. *Cell Physiol Biochem.* 9:179-86.
- Ludwig, A., X. Zong, M. Jeglitsch, F. Hofmann, and M. Biel. 1998. A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature.* 393:587-91.
- Luthi, A., T. Bal, and D.A. McCormick. 1998. Periodicity of thalamic spindle waves is abolished by ZD7288, a blocker of Ih. *J Neurophysiol.* 79:3284-9.
- Mannikko, R., F. Elinder, and H.P. Larsson. 2002. Voltage-sensing mechanism is conserved among ion channels gated by opposite voltages. *Nature.* 419:837-41.
- Markel, P., P. Shu, C. Ebeling, G.A. Carlson, D.L. Nagle, J.S. Smutko, and K.J. Moore. 1997. Theoretical and empirical issues for marker-assisted breeding of congenic mouse strains. *Nat Genet.* 17:280-4.
- Matulef, K., and W.N. Zagotta. 2003. Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 19:23-44.
- Mistrik, P., R. Mader, S. Michalakis, M. Weidinger, A. Pfeifer, and M. Biel. 2005. The murine HCN3 gene encodes a hyperpolarization-activated cation channel with slow kinetics and unique response to cyclic nucleotides. *J Biol Chem.* 280:27056-61.
- Molokanova, E., F. Maddox, C.W. Luetje, and R.H. Kramer. 1999. Activity-dependent modulation of rod photoreceptor cyclic nucleotide-gated channels mediated by phosphorylation of a specific tyrosine residue. *J Neurosci.* 19:4786-95.
- Molokanova, E., B. Trivedi, A. Savchenko, and R.H. Kramer. 1997. Modulation of rod photoreceptor cyclic nucleotide-gated channels by tyrosine phosphorylation. *J Neurosci.* 17:9068-76.
- Mongiovi, A.M., P.R. Romano, S. Panni, M. Mendoza, W.T. Wong, A. Musacchio, G. Cesareni, and P.P. Di Fiore. 1999. A novel peptide-SH3 interaction. *Embo J.* 18:5300-9.
- Much, B., C. Wahl-Schott, X. Zong, A. Schneider, L. Baumann, S. Moosmang, A. Ludwig, and M. Biel. 2003. Role of subunit heteromerization and N-linked glycosylation in the formation of functional hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels. *J Biol Chem.* 278:43781-6.
- Munsch, T., and H.C. Pape. 1999. Modulation of the hyperpolarization-activated cation current of rat thalamic relay neurones by intracellular pH. *J Physiol.* 519 Pt 2:493-504.
- Nolan, M.F., G. Malleret, K.H. Lee, E. Gibbs, J.T. Dudman, B. Santoro, D. Yin, R.F. Thompson, S.A. Siegelbaum, E.R. Kandel, and A. Morozov. 2003. The hyperpolarization-activated HCN1 channel is important for motor learning and neuronal integration by cerebellar Purkinje cells. *Cell.* 115:551-64.
- Pape, H.C. 1996. Queer current and pacemaker: the hyperpolarization-activated cation current in neurons. *Annu Rev Physiol.* 58:299-327.
- Resh, M.D. 1990. Membrane interactions of pp60v-src: a model for myristylated tyrosine protein kinases. *In Oncogene.* Vol. 5. 1437-44.
- Roskoski, R., Jr. 2004. Src protein-tyrosine kinase structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun.* 324:1155-64.
- Santoro, B., S.G. Grant, D. Bartsch, and E.R. Kandel. 1997. Interactive cloning with the SH3 domain of N-src identifies a new brain specific ion channel protein, with homology to eag and cyclic nucleotide-gated channels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:14815-20.
- Santoro, B., and G.R. Tibbs. 1999. The HCN gene family: molecular basis of the hyperpolarization-activated pacemaker channels. *Ann N Y Acad Sci.* 868:741-64.
- Seifert, R., A. Scholten, R. Gauss, A. Mincheva, P. Lichter, and U.B. Kaupp. 1999. Molecular characterization of a slowly gating human hyperpolarization-activated channel predominantly expressed in thalamus, heart, and testis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:9391-6.



- Stieber, J., S. Herrmann, S. Feil, J. Loster, R. Feil, M. Biel, F. Hofmann, and A. Ludwig. 2003. The hyperpolarization-activated channel HCN4 is required for the generation of pacemaker action potentials in the embryonic heart. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:15235-40.
- Stieber, J., F. Hofmann, and A. Ludwig. 2004. Pacemaker channels and sinus node arrhythmia. *Trends Cardiovasc Med*. 14:23-8.
- Tibbs, G.R., D.T. Liu, B.G. Leybold, and S.A. Siegelbaum. 1998. A state-independent interaction between ligand and a conserved arginine residue in cyclic nucleotide-gated channels reveals a functional polarity of the cyclic nucleotide binding site. *J Biol Chem*. 273:4497-505.
- Ulen, C., and J. Tytgat. 2001. Functional heteromerization of HCN1 and HCN2 pacemaker channels. *J Biol Chem*. 276:6069-72.
- Wahl-Schott, C., L. Baumann, X. Zong, and M. Biel. 2005. An arginine residue in the pore region is a key determinant of chloride dependence in cardiac pacemaker channels. *J Biol Chem*. 280:13694-700.
- Wainger, B.J., M. DeGennaro, B. Santoro, S.A. Siegelbaum, and G.R. Tibbs. 2001. Molecular mechanism of cAMP modulation of HCN pacemaker channels. *Nature*. 411:805-10.
- Wang, J., S. Chen, and S.A. Siegelbaum. 2001. Regulation of hyperpolarization-activated HCN channel gating and cAMP modulation due to interactions of COOH terminus and core transmembrane regions. *J Gen Physiol*. 118:237-50.
- Williams, R.L., D.J. Hilton, S. Pease, T.A. Willson, C.L. Stewart, D.P. Gearing, E.F. Wagner, D. Metcalf, N.A. Nicola, and N.M. Gough. 1988. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature*. 336:684-7.
- Xue, T., E. Marban, and R.A. Li. 2002. Dominant-negative suppression of HCN1- and HCN2-encoded pacemaker currents by an engineered HCN1 construct: insights into structure-function relationships and multimerization. *Circ Res*. 90:1267-73.
- Yellen, G. 2002. The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature*. 419:35-42.
- Zagotta, W.N., N.B. Olivier, K.D. Black, E.C. Young, R. Olson, and E. Gouaux. 2003. Structural basis for modulation and agonist specificity of HCN pacemaker channels. *Nature*. 425:200-5.
- Zong, X., C. Eckert, H. Yuan, C. Wahl-Schott, H. Abicht, L. Fang, R. Li, P. Mistrik, A. Gerstner, B. Much, L. Baumann, S. Michalakakis, R. Zeng, Z. Chen, and M. Biel. 2005. A novel mechanism of modulation of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels by Src kinase. *J Biol Chem*. 280:34224-32.
- Zong, X., J. Stieber, A. Ludwig, F. Hofmann, and M. Biel. 2001. A single histidine residue determines the pH sensitivity of the pacemaker channel HCN2. *J Biol Chem*. 276:6313-9.
- Zong, X., H. Zucker, F. Hofmann, and M. Biel. 1998. Three amino acids in the C-linker are major determinants of gating in cyclic nucleotide-gated channels. *Embo J*. 17:353-62.



## Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Biel für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Überlassung des Themas und die gute Betreuung der Arbeit bedanken.

Frau Prof. Dr. Vollmar danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Ich danke Herrn PD Dr. Xiangang Zong für die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen und die sehr gute Zusammenarbeit während meiner Doktorarbeit.

In diesem Zusammenhang danke ich auch Herrn Dr. Christian Wahl-Schott für die vielen anregenden Diskussionen und seine Unterstützung. Auch Herrn Dr. Robert Mader möchte ich sehr für seine Unterstützung danken.

Mein besonderer Dank gilt Daniela Scholz und Melanie Gebhard. Sie haben mich im Labor immer tatkräftig unterstützt.

Für die gewissenhafte Durchsicht meiner Arbeit bedanke ich mich bei Heidi und Christian.

Meinem Ex-Mitbewohner Bodo möchte ich für das heitere Zusammenleben (grün) und viele lustige Stunden danken.

Dass der Laboralltag meist lustig (danke für die Michalakís'schen Witze) und angenehm war, ist sämtlichen Mitgliedern unseres Arbeitskreises zu verdanken. Vor allem so manche feucht-fröhliche Feierabendrunde muss hier erwähnt werden.

So, das beste zum Schluss! Bei Heidi möchte ich mich vor allem für viiiiele lustige, aufregende, hin und wieder sehr anstrengende, aber meist schöne, feucht-fröhliche (Wodcki), interessante, intelligente und einfach nette Stunden bedanken.

---

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Eckert, Christian
Geburtstag	28.06.1973
Geburtsort	Eschenbach i.d.Opf
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

### Schulausbildung

09/1979-07/1983	Grundschule Auerbach
09/1983-07/1993	Gymnasium Pegnitz
	Abschluss Abitur

### Wehrdienst

10/1993-09/1994	Wehrdienst bei der FJg-LuV-Kp 909
-----------------	-----------------------------------

### Studium

03/1995-03/1997	Studium der Chemie an der Universität Bayreuth
03/1997-06/2002	Studium der Biologie an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

### Berufserfahrung

10/2002-06/2006	Promotion am Lehrstuhl der Pharmakologie für Naturwissenschaften der LMU München bei Herrn Prof. Dr. Biel
-----------------	---